



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**



Aktenzeichen: 100 13 296.0

Anmeldetag: 17. März 2000

Anmelder/Inhaber: Boehringer Ingelheim Pharma KG,
Ingelheim/DE

Bezeichnung: Neuer nichtselektiver Kationenkanal

IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 N



Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. April 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

1



Neuer nichtselektiver Kationenkanal

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für den nicht-selektiven Kationenkanal OTRPC4 kodieren sowie Polypeptide, die durch besagte Nukleinsäuren kodiert werden. Weiterhin betrifft die Erfindung Wirte bzw. Wirtszellen, die besagtes Polypeptid exprimieren und Verfahren zum Auffinden von Blocker, Aktivatoren sowie Modulatoren besagter OTRPC4-Kationenkanäle. Die Erfindung umfaßt Blocker, Aktivatoren und Modulatoren besagter OTRPC4-Kationenkanäle sowie pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend besagte Blocker, Aktivatoren und Modulatoren. Außerdem betrifft die Erfindung nicht humane Säuger, die entweder OTRPC4 als Transgen, inaktiviertes Gen (knock-out) oder modifiziertes Gen (knock-in) enthalten.

Hintergrund der Erfindung

Zellen sind je nach physiologischem Zustand des Gewebes, dem sie angehören unterschiedlichen extrazellulären Ionenkonzentrationen und damit unterschiedlichen Osmolaritäten ausgesetzt. Ein Absinken der extrazellulären Osmolarität führt zu einer intrazellulären Volumenzunahme durch Einstrom extrazellulärer Flüssigkeit. Diese Volumenzunahme bedroht die Homöostase der Zelle, so daß die Evolution ein Mechanismus entwickelte, dessen Aktivierung dazu führt, daß eine Zelle, die osmotisch bedingte Volumenzunahme aktiv gegenregulieren kann. Dieser Mechanismus wird als „regulated volume decrease“ (RVD) bezeichnet (zur Übersicht siehe Ref. 1). Der molekulare Mechanismus, der dem RVD zugrunde liegt, ist bisher nicht bekannt, allerdings wurde in verschiedenen Studien ein transienter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentrationen nachgewiesen, der mit der Volumenregulation einherging und durch Lanthan und Gadolinum hemmbar war. Möglicherweise ist also ein nicht-selektiver Kalzium-durchgängiger Kanal an dem RVD beteiligt.

In *C. elegans* wurde eine cDNA kloniert, die für einen Kanal kodiert, der Verwandtschaften zu der TRP („transient receptor potential“-)Familie von nicht-selektiven Kationenkanälen aufweist. Dieser Kanal ist für die Reaktionen von *C. elegans* auf Lösungen mit hoher Osmolarität verantwortlich und wurde deshalb OSM-9 genannt (2). Bisher ist aber noch nichts zu den biophysikalischen Charakteristika von OSM-9 bekannt, eine entsprechendes homologes Protein wurde bisher auch nicht für Säugetiere beschrieben.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

2

Die Familie von TRP-Kanälen (TRPCs) (3) kann in drei unterschiedliche Subfamilien unterteilt werden (4). Die größte Familie bildet die STRP-Subfamilie (short TRP; benannt nach ihrem kurz N-Terminus), bestehend aus den klassischen Drosophila-Kanäle TRP und TRPL (transient receptor potential-like) (5) sowie 7 Säugerhomologen von TRP (TRPC1-7) (6-15). Die Kanäle dieser Familie sind beteiligt an dem Kalzium-Einstrom, der durch die Aktivierung von Rezeptoren ausgelöst wird, denen gemeinsam ist, daß sie die Phospholipase C aktivieren. Die zweite Unterfamilie der TRPCs wurde OTRPC benannt, nach dem ersten Vertreter dieser Familie OSM-9. Die Kanäle dieser Familie werden aktiviert durch chemische und physikalische Reize. Zur OTRPC-Familie gehören der Vanilloid-Rezeptor (VR1) (16, 17), der vanilloid-like receptor (VRL-1, auch als GRC bekannt) (18, 19), und ein Kanal, dessen mögliche Funktion, die eines epithelialen Kalzium-Kanals ist (ECaC oder auch als CaT1 bekannt) (20, 21). VR1 ist ein nicht-selektiver Kalzium-permeabler Kanal, der aus dorsalen Ganglien-Zellen der Ratten kloniert wurde (16). Dieser Kanal wird aktiviert durch Hitze und durch die Substanz Capsaicin, die Schmerz-auslösend wirkt. Der kürzlich klonierte, dem VR1 verwandte Kanal, VRL-1, kann durch Hitze aktiviert werden und könnte in der Schmerzrezeption beteiligt sein (18). Allerdings könnte sein weit verbreitete Expression auch ein Hinweis dafür sein, daß dieser Kanal noch andere Funktionen hat, z.B. wurde kürzlich gezeigt, daß dieser Kanal an dem intrazellulären Transport des „insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) beteiligt ist (19). Andere Mitglieder dieser OTRPC-Familie sind ECaC, der aus Kaninchen-Niere kloniert wurde (20) und CaT1 (21), der aus Ratten-Duodenum kloniert wurde; beide Kanäle sind in der Sequenz identisch und sind an der Vitamin D ausgelösten Einstrom von Kalzium in epithelialen Zellen beteiligt (20, 21). Die dritte TRP-Subfamilie wurde LTRPC genannt (long TRP channels, nach ihrem langen N-terminus benannt) und besteht bislang aus den beiden Mitgliedern Melastatin (22) und TRPC7 (23).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen neuen TRP-Kanal mit vorteilhaften Eigenschaften gegenüber den oben beschriebenen, aus dem Stand der Technik bekannten Kanälen bereit zu stellen.

Beschreibung der Erfindung

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

3

Die Aufgabe wurde im Rahmen der Ansprüche und Beschreibung der vorliegenden Erfindung gelöst.

Die Verwendung der Einzahl oder des Plurals in den Ansprüchen oder der Beschreibung soll in keiner Weise limitierend sein und die andere Form ebenfalls mit einschließen. RNA und RNS bzw. DNA und DNS haben jeweils die gleiche Bedeutung.

Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für den nicht-selektiven Kationenkanal OTRPC4 oder für ein Fragment, eine funktionelle Variante, eine allele Variante, eine Untereinheit kodiert, oder Varianten der besagten Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes oder eine Nukleinsäure, die an besagte Nukleinsäure hybridisieren kann. Der erfindungsgemäße Kationenkanal bzw. OTRPC4 Polypeptide sind weiter unten beschrieben. Erfindungsgemäße OTRPC4 Nukleinsäuren sind bevorzugt eukaryontische Nukleinsäuren, besonders bevorzugt humane oder murine, aber auch aus der Ratte, Hamster, Ziegen, Rinder, Schweine, Schafe, Hund, Katze, Affen sowie weiteren dem Fachmann bekannte Eukaryonten. Beispielsweise ist besagte Nukleinsäure eine rekombinant hergestellte Nukleinsäure, z.B. eine cDNS. In den Abbildungen bzw. in dem Beispiel sind exemplarisch erfindungsgemäße Nukleinsäuren gezeigt.

Bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure RNS.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure DNS.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie 5' oder 3' oder 5' und 3' untranslatierte Regionen enthält. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann stromaufwärts und oder stromabwärts weitere untranslatierte Bereiche enthalten. Besagte untranslatierte Region kann ein regulatorisches Element, wie z.B. einen Transkriptionsinitiationseinheit (Promoter) oder Enhancer umfassen. Besagter Promoter kann beispielsweise ein konstitutiv aktiver oder induzierbarer oder Entwicklungsgesteuerter Promoter sein. Bevorzugt, ohne weitere bekannte Promoter auszuschließen, sind die konstitutiven Promoter des humanen Cytomegalovirus (CMV) und Rous Sarkomvirus (RSV), ebenso wie der Simianvirus 40 (SV40) und Herpes simplex Virus (HSV) Promoter. Erfindungsgemäße induzierbare Promoter umfassen Antibiotikum resistente Promoter, Hitzeschockpromoter, Hormon-induzierbare „Mouse Mammary Tumor Virus“ (MMTV)-Promoter und den Metallothionein-Promoter.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case I-1128

4

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Fragment des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 kodiert.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine funktionelle Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 kodiert.

5 Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine allele Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 kodiert.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie für Varianten der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes kodiert.

10 Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie an eine erfindungsgemäße Nukleinsäure unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann. Stringente Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und finden sich insbesondere in Sambrook et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß 15 besagter nicht-selektiver Kationenkanal OTRPC4 ein Säugerkationenkanal ist.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß besagter nicht-selektiver Kationenkanal OTRPC4 murin ist.

Weiterhin bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß besagter nicht-selektiver Kationenkanal OTRPC4 human ist.

20 Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die Sequenz

CTCTACCGCCTACTACCAAGCCGCTGGAGGGCACAATGGCGGATTCCAGCGAA
GGCCCCGCGCGGGGCCCCGGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGG
CACCCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGG
25 GGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTACCGGCTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCC
AGGCGATGGGCGACCAAAATCTGCGCATGAAGTTCCAGGGCGCCTTCCGCAAGG
GGGTGCCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGG
TGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATC
GTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAG
30 CCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTC
AACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGAC
GGGCTGCTCCCATTCCTTGCTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTT

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

5

CGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAG
CAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCG
GCAACATGCGGGAGTTCATTAACCTCGCCCTTCGCTGACATCTACTATCGAGGTC
AGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACACTACGTGGAACCTC
1 TCCTGGCCOCAGGGAGCTGATGTCCA₆GCCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGC
CCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCCCTGTGCTGGCTG
CCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGA
AGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTG
GTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTAC
10 GACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCCGCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCC
GTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCCTCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAA
GATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACAC
GGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGTATTCTCTCGC
TTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGA
15 TCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGAG
CCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTC
TACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACCGCCT
ACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCCTTACCGCACACGGTGGAC
TACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCAATTACGCTCTTCACTGGGGTCCCTGTTCTTC
20 TTCACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTC
TTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCTGGTGATCG
TCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCT
TTGCCCTGGTCTCTGGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGC
TGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCC
25 GATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTC
CCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACCAACT
GCACAGTGCCCACTTACCOCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCC
TCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCA
GCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCA
30 CCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCC
AGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATC
CTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

6

GAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGTG
CTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCA
TCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCATA
CCGTGGGCCGCTCCGCAGGGATCGCTGGTCCCTCGGTGGTACCCCGCGTGGTG
5 GAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCAT
GGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGA
CTGAGGACGCCCCGCTCTAGGGACTGCAGCCCAGCCCCAGCTTCTCTGCCCACT
CATTTCTAGTCCAGCCGCATTTTCAGCAGTGCCTTCTGGGGTGTCCCCCACACC
CTGCTTTGGCCCCAGAGGCGAGGGACCAGTGGAGGTGCCAGGGAGGCCCCAGG
10 ACCCTGTGGTCCCCTGGCTCTGCCTCCCCACCCTGGGGTGGGGGCTCCCGGCCA
CCTGTCTTGCTCCTATGGAGTCACATAAGCCAACGCCAGAGCCCCTCCACCTCA
GGCCCCAGCCCCTGCCTCTCCATTATTTATTTGCTCTGCTCTCAGGAAGCGACG
TGACCCCTGCCCCAGCTGGAACCTGGCAGAGGCCTTAGGACCCCGTTCCAAGTG
CACTGCCCGGCCAAGCCCCAGCCTCAGCCTGCGCCTGAGCTGCATGCGCCACCA
15 TTTTTGGCAGCGTGGCAGCTTTGCAAGGGGGCTGGGGCCCTCGGCGTGGGGCCA
TGCCTTCTGTGTGTCTGTAGTGTCTGGGATTTGCCGGTGCTCAATAAATGTTTA
TTCATTGACGGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von
20 besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Codes umfaßt. Erfindungsgemäß ist mit der oben dargestellten Sequenz die humane OTRPC4 DNS Sequenz mit 5' und 3'-untranslatierten Sequenzen umfaßt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind nach der international anerkannten IUPAC Nomenklatur angegeben, d.h. unter R wird ein A oder G, unter M ein A oder C, unter S ein
25 C oder G, unter Y ein C oder T, unter K ein G oder T und unter W ein A oder T verstanden.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die Sequenz

CTCTACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACAATGGCGGATTCCAGCGAA
30 GGCCCCCGCGCGGGGCCCGGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGG
CACCCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGG
GGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTCACCGGCTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

7

AGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCCAGGGCGCCTTCCGCAAGG
GGGTGCCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGG
TGCTTGGGCCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATC
GTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAG
5 CCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTC
AACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGAC
GGGCTGCTCCCATTTCTTGCTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTT
CGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAG
CAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCG
10 GCAACATGCGGGAGTTCATTAACTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCGAGGTC
AGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACACTACGTGGAACCTC
TCGTGGCCCAAGGAGCTGATGTCCACGCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGC
CCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGGCTG
CCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGA
15 AGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTG
GTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTAC
GACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCC
GTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCTCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAA
GATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACAC
20 GGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGTATTCTTCGC
TTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGA
TCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGAG
CCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTC
TACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACCGCCT
25 ACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCACGGTGGAC
TACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCCTGTTCTTC
TTCACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTC
TTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTATCG
TCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCT
30 TTGCCCTGGTCTGCGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGC
TGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCC
GATTCCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

8

CCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACCAACT
GCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCC
TCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCA
GCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCA
5 CCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCC
AGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATC
CTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGG
GAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGTG
CTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCA
10 TCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCATA
CCGTGGGCGCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCCCTCGGTGGTACCCCGCGTGGTG
GAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCAT
GGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGA
CTGAGGACGCCCCGCTCTAGGGACTGCAGCCCAGCCCCAGCTTCTCTGCCCACT
15 CATTTCTAGTCCAGCCGCATTTACGACAGTGCCTTCTGGGGTGTCCCCCACACC
CTGCTTTGGCCCCAGAGGCGAGGGACCAGTGGAGGTGCCAGGGAGGCCCCAGG
ACCCTGTGGTCCCCTGGCTCTGCCTCCCCACCCTGGGGTGGGGGCTCCCGGCCA
CCTGTCTTGCTCCTATGGAGTCACATAAGCCAACGCCAGAGCCCCTCCACCTCA
GGCCCCAGCCCCTGCCTCTCCATTATTTATTTGCTCTGCTCTCAGGAAGCGACG
20 TGACCCCTGCCCCAGCTGGAACCTGGCAGAGGCCTTAGGACCCCGTTCCAAGTG
CACTGCCCCGGCCAAGCCCCAGCCTCAGCCTGCGCCTGAGCTGCATGCGCCACCA
TTTTTGGCAGCGTGGCAGCTTTGCAAGGGGGCTGGGGCCCTCGGCGTGGGGCCA
TGCCTTCTGTGTGTTCTGTAGTGTCTGGGATTTGCCGGTGCTCAATAAATGTTTA
TTCATTGACGGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

25 hat. Die oben dargestellten Sequenz ist erfindungsgemäß die humane OTRPC4 DNS
Sequenz mit 5' und 3'-untranslatierten Sequenzen.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die
Sequenz

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGCGGGGCGGGGAGGTGGCTGAGCT
30 CCCCAGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCTCTCTCCTCCCT
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTCACCGGCTGATGC
CAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

9

AGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACC
CTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCCTGGGCCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTG
TTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAA
GAAGATCATAGAGAAGCAGCCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGC
5 CCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGG
GCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATTTCTTGCTGACCCACAAGAAAC
GCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCC
AAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTG
GACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGGGAGTTCATTAACCTCGCCCTTCCGT
10 GACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGC
AAACACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCAGGGAGCTGATGTCCAAGCCAGGCC
CGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGA
GCTGCCCTGTGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCT
GACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGC
15 AACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACAC
CAAGTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCCGCTCTT
CCCCGACAGCAACCTGGAGGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCCTCAT
GATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGG
AGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCC
20 TATGGGCCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGG
GAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCG
CCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGC
GCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCA
TGGTCATCTTCACTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGT
25 ACCCTTACCGCACCAACGGTGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGC
TCTTCACTGGGGTCCTGTTCTTCTTCAACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGA
AATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTT
CATCTACTCTGTCCTGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGA
GGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCCCT
30 TTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAA
GATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATC
GGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

10

TGCAATGAGGACCAGACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGAC
AGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATG
GGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTG
CTGGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCC
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAG
CTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCGTATTCCCTG
AGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGG
CACTCCTGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTG
GAACCAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACC
AGTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCCT
CGGTGGTACCCCGCGTGGTGGAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTG
GTGGTGCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGG
TTACCCCGCAAGTGGAGGACTGAGGACGCCCCGCTCTAG

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten
Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von
besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Codes
umfaßt. Erfindungsgemäß ist mit der oben dargestellten Sequenz die humane OTRPC4
cDNS Sequenz umfaßt.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die
Sequenz

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGCGGGGCCGGGAGGTGGCTGAGCT
CCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCT
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTCACCGGCTGATGC
CAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCC
AGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACC
CTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTG
TTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAA
GAAGATCATAGAGAAGCAGCCGAGAGCCCCAAAGCCCTGCCCTCAGCCGC
CCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGG
GCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATTTCTTGCTGACCCACAAGAAAC
GCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCC
AAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

11

GACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGGGAGTTCATTAACCTCGCCCTTCCGT
GACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGC
AAACACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCAGGGAGCTGATGTCCAAGCCCAGGCC
CGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGA
5 GCTGCCCCTGTCGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCT
GACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGC
AACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACAC
CAAGTTTGTTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTT
CCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCTCAT
10 GATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGG
AGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCG
TATGGGCCAGTGTATTCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGG
GAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCG
CCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGC
15 GCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCA
TGGTCATCTTCACTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGT
ACCCTTACCGCACACCGGTGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCAATTACGC
TCTTCACTGGGGTCCTGTTCTTCTTCAACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGA
AATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTT
20 CATCTACTCTGTCTGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGA
GGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATGCCCT
TTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAA
GATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATC
GGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTG
25 TGCAATGAGGACCAGACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGAC
AGCGAGACCTTCAGCACCTTCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATG
GGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTG
CTGGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCC
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAG
30 CTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTG
AGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGG
CACTCCTGACCGCAGGTGGTGCTTCAAGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

12

GAACCAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACC
AGTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCTCCGCAGGGATCGCTGGTCCT
CGGTGGTACCCCGCGTGGTGGAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTG
GTGGTGCCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGG
5 TTACCCCCGCAAGTGGAGGACTGAGGACGCCCCGCTCTAG

hat. Die oben dargestellten Sequenz ist erfindungsgemäß die humane OTRPC4 cDNS Sequenz.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die Sequenz

10 GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGTGGCRGSRGGAKCAG
GACTCGGCCGGAGGGATCAGGAAGCGGCGGCGCTGCGCCCGCGTCCTGAGGCT
GAGAAGTACAAACAGATCTGGGTCCAGTATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCC
GTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCCCCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCT
GGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAA
15 GGCTCCTCTTCTCTTTCCCCGGTGGATGCTAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGAT
GGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCAGGGCGCTTTCGCAAGGGGGTTCCTCC
AACCCATTGACCTGTTGGAGTCCACCCGGTACGAGTCCTCAGTAGTGCTGGG
CCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTGTTCGACTACGGCACTTACCGTCACCAC
CCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAAAGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGA
20 GCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGC
CCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCTCCACTGCGGACCTAGATGGACTGC
TCTCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCCTGACTGATGAGGAGTTCCGGGAGC
CGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGG
CGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGACATTGCGGAGCGCACCGGCAACAT
25 GCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGACATCTACTACCGAGGCCAGACATC
CCTGCACATTGCCATCGAACGGCGCTGCAAGCACTACGTGGAGCTGCTGGTGG
CCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCCCGCGGCGCTTCTTCCAGCCCAAG
GATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTTGTCCTTGGCAGCCTGC
ACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGACAGAGAACCCTCACAAGAAAGC
30 TGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGAACACGGTGCTGCACGCGCTGGTGG
CCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTACGAC
CTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGACAGTT

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

13

CTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATGGCTGCCAAGACAGGCAAGATC
GGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGTGACAGATGAGGACACCCGGCA
TCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCTGTGTATTCTTCTCTCTA
CGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGGAGGTGTCCGTGCTGGAGATCCT
5 GGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCATGAGATGCTGGCTGTAGAGCCCA
TTAACGAACTGTTGAGAGACAAGTGGCGTAAGTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACA
TCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACCCTCACCGCCTACTA
TCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCTACCCTTACCGGACCACAGTGGACTACCT
GAGGCTGGCTGGCGAGGTGATCACGCTCTTCACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTAC
10 CAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGT
CGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTTCATCTACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCT
GCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCCTACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCC
CTGGTCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTACTTCACGCGCGGGTTGAAGCTGAC
GGGGACCTACAGCATCATGATTCAGAAGATCCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTT
15 CCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGCTATGCCTCAGCCCTGGTCACCCTC
CTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGTGACGAGGACCAGAGCAACTGCAC
GGTGCCACGTATCCTGCGTGCGCGACAGCGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCT
GGACCTCTTCAAAGCTCACCATCGGCATGGGAGACCTGGAGATGCTGAGCAGCG
CCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCTGGTCACCTACATCATCCTCACCTT
20 CGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTCATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGT
GTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGG
ACATCGAGCGTTCCTTCCCTGTGTTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCCGGAGAGA
TGGTGACTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCACTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTC
AGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCATTAA
25 CGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCAGTACTATGGCTTCTCCCACACCGT
GGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCTCGGTGGTGCCCCGCGTAGTGGAGC
TGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGGTGGTACCCCTGGATAACCTAGGG
AACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGCTACGCTCCCAAGTGGAGGACGGA
CGATGCCCCACTGTAGGGGCCGTGCCAGAGCTCGCACAGATAGTCCAGGCTTG
30 GCCTTCGCTCCCACCTACATTTAGGCATTTGTCCGGTGTCTTCCCACACCCGCAT
GGGACCTTGGAGGTGAGGGCCTCTGTGGCGACTCTGTGGAGGCCCCAGGACCC
TCTGGTCCCCGCCAAGACTTTTGCCCTTCAGCTCTACTCCCCACATGGGGGGGCG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

14

GGGCTCCTGGCTACCTGTCTCGCTCGCTCCCATGGAGTCACCTAAGCCAGCACA
AGGCCCCTCTCCTCGAAAGGCTCAGGCCCCATCCCTCTTGTGTATTATTTATTGC
TCTCCTCAGGAAAATGGGGTGGCAGGAGTCCACCCGCGGCTGGAACCTGGCCA
GGGCTGAAGCTCATGCAGGGACGCTGCAGCTCCGACCTGCCACAGATCTGACC
TGCTGCAGCCCTGGCTAGTGTGGGTCTTCTGTACTTTGAAGAGATCGGGGGCCGC
TGGTGCTCAATAAATGTTTATTCTCGGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
AA

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten
Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von
besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes
umfaßt, worin R ein A oder G, M ein A oder C, S ein C oder G, Y ein C oder T, K ein G
oder T und W ein A oder T sein kann. Erfindungsgemäß ist mit der oben dargestellten
Sequenz die murine OTRPC4 DNS Sequenz mit 5' und 3'-untranslatierten Sequenzen
umfaßt.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die
Sequenz

GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGTGGCRGSRGGAKCAG
GACTCGGCCGGAGGGATCAGGAAGCGGCGGCGCTGCGCCCGCGTCCTGAGGCT
GAGAAGTACAAACAGATCTGGGTCCAGTATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCC
GTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCCCCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCT
GGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAA
GGCTCCTCTTCTCTTTCCCCGGTGGATGCTAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGAT
GGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCAGGGCGCTTTCCGCAAGGGGGTTCCC
AACCCCATTTGACCTGTTGGAGTCCACCCGGTACGAGTCCTCAGTAGTGCCTGGG
CCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTGTTCGACTACGGCACTTACCGTCACCAC
CCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAAAGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGA
GCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGC
CCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCTCCACTGCGGACCTAGATGGACTGC
TCTCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCCTGACTGATGAGGAGTTCCGGGAGC
CGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGG
CGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGACATTGCGGAGCGCACCGGCAACAT

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

15

GCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGACATCTACTACCGAGGCCAGACATC
CCTGCACATTGCCATCGAACGGCGCTGCAAGCACTACGTGGAGCTGCTGGTGG
CCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCCCGCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAG
GATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTTGTCCTTGGCAGCCTGC
5 ACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGACAGAGAACCCTCACAAGAAAGC
TGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGGAACACGGTGCTGCACGCGCTGGTGG
CCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACAACCAAGTTTGTACCAAGATGTACGAC
CTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGACAGTT
CTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATGGCTGCCAAGACAGGCAAGATC
10 GGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGTGACAGATGAGGACACCCGGCA
TCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCTGTGTATTCTTCTCTTA
CGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGGAGGTGTCCGTGCTGGAGATCCT
GGTGTAACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCATGAGATGCTGGCTGTAGAGCCCA
TTAACGAACTGTTGAGAGACAAGTGGCGTAAGTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACA
15 TCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGTCATCTTACCCTCACCGCCTACTA
TCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCTACCCTTACCGGACCACAGTGGACTACCT
GAGGCTGGCTGGCGAGGTCATACGCTCTTCACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTAC
CAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGT
CGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATCTACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCT
20 GCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCCTACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCC
CTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTACTTCACGCGCGGGTTGAAGCTGAC
GGGGACCTACAGCATCATGATTGAGAAGATCCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTT
CCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGCTATGCCTCAGCCCTGGTCACCCTC
CTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGTGACGAGGACCAGAGCAACTGCAC
25 GGTGCCCACGTATCCTGCGTGCCGCGACAGCGAGACCTTCAGCGCCTTCCCTCCT
GGACCTCTTCAAAGCTCACCATCGGCATGGGAGACCTGGAGATGCTGAGCAGCG
CCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCTGGTCACCTACATCATCCTCACCTT
CGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTCATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGT
GTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGG
30 ACATCGAGCGTTCCTTCCCTGTGTTCTGAGGAAGGCCCTTCCGCTCCGGAGAGA
TGGTGACTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCACTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTC
AGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCATTAA

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

16

CGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCAGTACTATGGCTTCTCCCACACCGT
GGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCCTCGGTGGTGCCCCGCGTAGTGGAGC
TGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGGTGGTACCCCTGGATAACCTAGGG
AACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGCTACGCTCCCAAGTGGAGGACGGA
CGATGCCCCACTGTAGGGGCGGTGCCAGAGCTCGCACAGATAGTCCAGGCTTG
GCCTTCGCTCCCACCTACATTTAGGCATTTGTCCGGTGTCTTCCCACACCCGCGAT
GGGACCTTGGAGGTGAGGGCCTCTGTGGCGACTCTGTGGAGGCCCCAGGACCC
TCTGGTCCCCGCCAAGACTTTTGCCTTCAGCTCTACTCCCCACATGGGGGGGCG
GGGCTCCTGGCTACCTGTCTCGCTCGCTCCCATGGAGTCACCTAAGCCAGCACA
AGGCCCTCTCCTCGAAAGGCTCAGGCCCCATCCCTCTTGTGTATTATTTATTGC
TCTCCTCAGGAAAATGGGGTGGCAGGAGTCCACCCGCGGTGGAACCTGGCCA
GGGCTGAAGCTCATGCAGGGACGCTGCAGCTCCGACCTGCCACAGATCTGACC
TGCTGCAGCCCTGGCTAGTGTGGGTCTTCTGTACTTTGAAGAGATCGGGGGCCGC
TGGTGCTCAATAAATGTTTATTCTCGGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
AA

hat, worin R ein A oder G, M ein A oder C, S ein C oder G, Y ein C oder T, K ein G oder T und W ein A oder T sein kann. Die oben dargestellten Sequenz ist erfindungsgemäß die murine OTRPC4 DNS Sequenz mit 5' und 3'-untranslatierten Sequenzen.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die Sequenz

ATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCCGTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCC
CCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCTGGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCT
GGCCAATCTGTTTGGAGGGGGAGGAAGGCTCCTCTTCTCTTTCCCCGGTGGATGC
TAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGATGGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCA
GGGCGCTTTCCGCAAGGGGGTTCCCAACCCCATTGACCTGTTGGAGTCCACCCG
GTACGAGTCCTCAGTAGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTGTT
CGACTACGGCACTTACCGTCACCACCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAA
AGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGAGCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCC
CCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGCCCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCT
CCACTGCGGACCTAGATGGACTGCTCTCCTTCTTGTTGACCCACAAGAAGCGCC
TGACTGATGAGGAGTTCCGGGAGCCGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

17

GCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGGCGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGA
CATTGCGGAGCGCACCCGGCAACATGCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGA
CATCTACTACCGAGGCCAGACATCCCTGCACATTGCCATCGAACGGGCGCTGCAA
GCACTACGTGGAGCTGCTGGTGGCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCC
5 GCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGC
TGCCCTTGTCCTTGGCAGCCTGCACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGA
CAGAGAACCCCTCACAAGAAAGCTGACATGAGGGCGACAGGACTCGAGGGGGAAC
ACGGTGCTGCACGCGCTGGTGGCCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACACCAA
GTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCC
10 GACAGCAACCTGGAGACAGTTCTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATG
GCTGCCAAGACAGGCAAGATCGGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGT
GACAGATGAGGACACCCGGCATCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATG
GGCCTGTGTATTCTTCTCTACGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGG
AGGTGTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCAT
15 GAGATGCTGGCTGTAGAGCCCATTAACGAACCTGTTGAGAGACAAGTGCGCTAA
GTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGT
CATCTTCACCCTCACCGCCTACTATCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCTACCC
TTACCGGACCACAGTGGACTACCTGAGGCTGGCTGGCGAGGTCATCACGCTCTT
CACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTACCAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATG
20 CCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGTGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATC
TACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCTGCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCC
TACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTAC
TTCACGCGCGGGTTGAAGCTGACGGGGACCTACAGCATCATGATTCAGAAGAT
CCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTTCCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGC
25 TATGCCTCAGCCCTGGTCACCCCTCCTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGT
GACGAGGACCAGAGCAACTGCACGGTGGCCACGTATCCTGCGTGCCGCGACAG
CGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCTGGACCTCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGG
AGACCTGGAGATGCTGAGCAGCGCCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCT
GGTCACCTACATCATCCTCACCTTCGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTC
30 ATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGTGTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTT
GCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATCGAGCGTTCCCTCCCTGTGTTCCCTGAG
GAAGGCCTTCCGCTCCGGAGAGATGGTGACTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCA

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

18

CTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGG
AACCAGAACTTGGGCATCATTAAACGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCA
GTACTATGGCTTCTCCACACCGTGGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCCTC
GGTGGTGCCCCGCGTAGTGGAGCTGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGG
5 TGGTACCCCTGGATAACCTAGGGAACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGC
TACGCTCCCAAGTGGAGGACGGACGATGCCCCACTGTAG

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Codes
10 umfaßt. Erfindungsgemäß ist mit der oben dargestellten Sequenz die murine OTRPC4 cDNS Sequenz umfaßt.

Weiterhin bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die Sequenz

ATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCCGTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCC
15 CCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCTGGTGGGGAGGCCCTTCCCCCTCTCTTCCCT
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAAGGCTCCTCTTCTCTTTCCCGGTGGATGC
TAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGATGGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCA
GGGCGCTTTCCGCAAGGGGGTTCCCAACCCCATTGACCTGTTGGAGTCCACCCG
GTACGAGTCCTCAGTAGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTGT
20 CGACTACGGCACTTACCGTCACCAACCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAA
AGGTCTGTGGAGAAGCAGCCACAGAGCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCC
CCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGCCCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCT
CCACTGCGGACCTAGATGGACTGCTCTCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCC
TGACTGATGAGGAGTTCCGGGAGCCGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAG
25 GCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGGCGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGA
CATTGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGA
CATCTACTACCGAGGCCAGACATCCCTGCACATTGCCATCGAACGGCGCTGCAA
GCACTACGTGGAGCTGCTGGTGGCCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCCC
GCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGC
30 TGCCCTTGTCCTGGCAGCCTGCACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGA
CAGAGAACCCTCACAAGAAAGCTGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGAAAC
ACGGTGCTGCACGCGCTGGTGGCCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACACCAA

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

19

TTTTGTCACCAAGATGTACGACCTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCTCTTCCCC
GACAGCAACCTGGAGACAGTTCTCAACAATGATGGCCTTTTCGCTCTCATGATG
GCTGCCAAGACAGGCAAGATCGGGGTCTTTACGACATCATCCGACGTGAGGT
GACAGATGAGGACACCCGGCATCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATG
5 GGCCTGTGTATTCTTCTCTCTACGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGG
AGGTGTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCAT
GAGATGCTGGCTGTAGAGCCCATTAACGAAGTGTGAGAGACAAGTGGCGTAA
GTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGT
CATCTTCACCCTCACCCTACTATCAGCCACTGGAGGGCAGCCACCCTACCC
10 TTACCGGACCACAGTGGACTACCTGAGGCTGGCTGGCGAGGTCATCACGCTCTT
CACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTACAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATG
CCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGTCGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATC
TACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCTGCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCC
TACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTAC
15 TTCACGCGCGGGTTGAAGCTGACGGGGACCTACAGCATCATGATTCAGAAGAT
CCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTTCCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGC
TATGCCTCAGCCCTGGTCACCTCCTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGT
GACGAGGACCAGAGCAACTGCACGGTGCCACGTATCCTGCGTGCCGCGACAG
CGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCTGGACCTCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGG
20 AGACCTGGAGATGCTGAGCAGCGCCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCT
GGTCACCTACATCATCCTCACCTTCGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTC
ATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGTGTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTT
GCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATCGAGCGTTCCTTCCCTGTGTTCCCTGAG
GAAGGCCTTCCGCTCCGGAGAGATGGTGACTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCA
25 CTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGG
AACCAGAACTTGGGCATCATTAACGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCA
GTACTATGGCTTCTCCACACCGTGGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCCTC
GGTGGTGGCCCCGCGTAGTGAGCTGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGG
TGGTACCCCTGGATAACCTAGGGAACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGC
30 TACGCTCCCAAGTGGAGGACGGACGATGCCCCACTGTAG

hat. Die oben dargestellten Sequenz ist erfindungsgemäß die murine OTRPC4 cDNA Sequenz.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist ein rekombinanter Vektor dadurch gekennzeichnet, daß er eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, wie oben beschrieben, enthält. Beispiele für erfindungsgemäße Vektoren sind virale Vektoren wie z. B. Vaccinia, Semliki-Forest-Virus und Adenovirus. Vektoren zur Verwendung in COS-Zellen besitzen den Simian Virus (SV) 40 „origin of replication“ und ermöglichen hohe Kopienzahlen der Plasmide. Vektoren zur Verwendung in Insektenzellen sind beispielsweise *E. coli* Transfervektoren und enthalten z.B. als Promotor die für Polyhedrin kodierende DNA.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßer rekombinanter Vektor dadurch gekennzeichnet, daß er ein Expressionsvektor ist.

10 Noch eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Wirt, dadurch gekennzeichnet, daß er einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Ein erfindungsgemäßer Wirt exprimiert ein erfindungsgemäßes OTRPC4 Polypeptid beispielsweise an der Zelloberfläche, z.B. in die Plasmamembran integriert. Die erfindungsgemäßen Wirte können transient oder stabil mit einem der besagten Vektoren transfiziert sein. Ein solcher Wirt ist
15 exemplarisch in Beispiel 1, Abbildung 4 der Erfindung beschrieben.

Noch eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßer Wirt, welcher eine eukaryontische Wirtszelle ist. Erfindungsgemäße eukaryontische Wirtszellen umfassen Pilze, wie z. B. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Trichoderma*. Ein weiterer bevorzugter erfindungsgemäßer Wirt ist
20 eine Insektenzelle (z.B. aus *Spodoptera frugiperda* Sf-9, mit einem Baculovirus-Expressionssystem). Erfindungsgemäße Zellen umfassen auch Oozyten, beispielsweise von Fröschen oder Kröten. Erfindungsgemäße Wirte können auch Pflanzenzellen sein, z.B. von *Nicotiana tabacum*. In Säugerzellen und -zelllinien werden die erfindungsgemäßen OTRPC4-Polypeptide besonders gut exprimiert. Daher ist ein bevorzugter
25 erfindungsgemäßer Wirt eine Säugerzelle. Beispiele für erfindungsgemäße Säugerzellen sind HEK293-, HeLa-, COS-, BHK-, CHO-Zellen.

Ganz besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßer Wirt daher eine Sf9-, HEK293- oder HeLa- Zelle.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßer Wirt ein Bakteriophage. Beispielhaft sei Baculovirus
30 genannt.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

21

Ein weiterer erfindungsgemäßer Wirt ist eine prokaryontische Wirtszelle. Beispiele für erfindungsgemäße prokaryontische Wirtszellen sind *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* oder auch *Proteus mirabilis*.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Polypeptid, das durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kodiert wird oder ein Fragment, eine funktionelle Variante, eine allele Variante, eine Untereinheit, eine Variante aufgrund des degenerativen Nukleinsäure-Kodes oder eine Glykosilierungsvariante hiervon. Im Rahmen dieser Erfindung wird unter OTRPC4-Polypeptid oder Fragment hiervon eines oder mehrere der hier beschriebenen Polypeptid(e) verstanden, d.h. ein Polypeptid ausgewählt aus Fragmenten, allelen Varianten, funktionelle Untereinheiten, Varianten aufgrund des degenerativen Nukleinsäure-Kodes, ein chemisches Derivat hiervon, ein Fusionsprotein mit besagtem Polypeptid oder eine Glykosilierungsvariante von OTRPC4. Erfindungsgemäße OTRPC4-Polypeptide sind bevorzugt eukaryontische Polypeptide, besonders bevorzugt humane oder murine, aber auch aus der Ratte, Hamster, Ziegen, Rinder, Schweine, Schafe, Hund, Katze, Affen sowie aus weiteren dem Fachmann bekannte Eukaryonten. OTRPC4 im Rahmen dieser Erfindung ist ein neuer Kationenkanal, der gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Kationenkanälen die vorteilhafte Eigenschaft aufweist, daß er durch Veränderungen der Osmolarität des extrazellulären Mediums reguliert wird. Er stellt daher eine gegenüber aus dem Stand der Technik bekannten Kationenkanälen einen völlig neue Generation von Kationenkanälen dar, die z.B. als Osmosensoren für die Regulation des Zellvolumens verantwortlich sind. Durch Erniedrigung der Osmolarität wird die Kanalaktivität stimuliert und durch Erhöhung gehemmt. Z.B. ist der Kanal bei physiologischer Osmolarität von ca. 300 mosmol/l konstitutiv aktiv. Der Kanal ist nichtselektiv in seiner Ionenpermeabilität, d.h. durchgängig für alle Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) und zeigt z.B. eine gewisse Präferenz für Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$: ca. 6).

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches ein Fragment des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist. Hierunter wird ein Teil des erfindungsgemäßen Polypeptides verstanden.

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches eine funktionelle Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist. Hierunter werden Polypeptide verstanden, die weitgehend ähnlich wie OTRPC4 sind und die dieselbe biologische Aktivität wie OTRPC4 aufweisen

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

22

oder eine inhibitorische Aktivität für OTRPC4 haben. Eine Variante von OTRPC4 kann durch Substitution, Deletion oder Addition einer oder mehrerer Aminosäuren von OTRPC4 sich unterscheiden, bevorzugt durch 1 bis 10 Aminosäuren. Beispielsweise werden unter funktionelle Varianten weitere Vertreter der OTRPC4-Familie verstanden, die ebenfalls die oben beschriebene vorteilhafte Eigenschaft der Regulierung der Kanalaktivität durch Osmolarität aufweisen.

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches eine allele Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.

10 Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches eine Untereinheit des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist. Oft sind Ionenkanäle aus Untereinheiten zusammengesetzt, beispielsweise der AMPA-Rezeptor. Entsprechend werden von der Erfindung auch Untereinheiten des OTRPC4-Kationenkanals umfaßt.

15 Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches eine Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 aufgrund des degenerativen Nukleinsäure-Kodes ist.

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches ein chemisches Derivat des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist. Hierunter werden Moleküle verstanden, die aus den erfindungsgemäßen OTRPC4 Polypeptiden durch chemische Reaktionen hergestellt werden, beispielsweise durch Iodinierung, Acetylierung, Bindung an ein Effektormolekül oder Radioisotop oder an ein Toxin.

20 Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches ein Fusionsprotein aus dem nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 und einem weiteren Protein ist. Ein solches Fusionsprotein kann beispielsweise durch rekombinante Expression der erfindungsgemäßen OTRPC4 Nukleinsäure, die an eine weitere Nukleinsäure fusioniert ist, die sämtliche kodierende Information „in frame“ enthält, hergestellt werden. Dies kann beispielsweise ein 25 Markerprotein oder ein Reporterprotein wie GFP oder LacZ sein. Weitere Fusionspartner sind dem Fachmann bekannt.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

23

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches eine Glykosilierungsvariante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.

Die Erfindung umfaßt Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Polypeptiden, dadurch gekennzeichnet, daß ein erfindungsgemäßer Wirt kultiviert wird und besagtes Polypeptid exprimiert wird. Besagte Wirte können z.B. stabil oder transient mit einem Vektor oder einem Expressionsvektor, der eine für ein OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment kodierende Nukleinsäure enthält, transfiziert werden. Beispielsweise wird das erfindungsgemäße OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment an der Zelloberfläche des Wirtes exprimiert. Besagtes Polypeptid kann aber auch in das Medium sezerniert werden. Die erfindungsgemäßen OTRPC4-Polypeptide oder -Fragmente können in einem erfindungsgemäßen Verfahren beispielsweise in Pilzen, wie z. B. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Trichoderma* mit Vektoren, die zur Oberflächenexpression führen, hergestellt werden.

Auch mit Insektenzellen kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der OTRPC4-Polypeptides oder -Fragmentes durchgeführt werden, z. B. als transientes oder stabiles Expressionssystem oder Baculovirus-Expressionssystem. Hierbei werden z.B. Sf-9 Insektenzellen mit z.B. *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) oder verwandten Viren infiziert. Die oben beschriebenen *E. coli* Transfervektoren enthalten z.B. als Promotor die für Polyhedrin kodierende DNA, hinter der die für das erfindungsgemäße OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment kodierende DNA hineinkloniert wird. Nach Identifikation eines korrekten Transfervektorklones in *E. coli* wird dieser zusammen mit unvollständiger Baculovirus-DNA in eine Insektenzelle transfiziert und rekombiniert mit der Baculovirus-DNA, um funktionsfähige Baculoviren zu bilden. Mit Hilfe starker Insektenzellpromotoren werden in einem erfindungsgemäßen Verfahren große Mengen des erfindungsgemäßen OTRPC4-Polypeptides oder -Fragmentes gebildet. Insektenzellexpressionssysteme für die Expression von OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment sind kommerziell erhältlich.

Auch ein Säugetiierrepressionssystem, z.B. in einem erfindungsgemäßen Wirt, z.B. die HEK293-Zelle oder die Hela-Zelle, die beispielsweise in einem Expressionsvektor eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kodierend für OTRPC4 oder ein Fragment hiervon enthält, kann zur Expression des OTRPC4-Kationenkanals verwendet werden, wobei der besagte

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

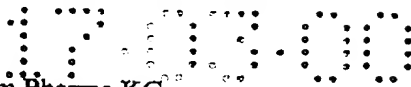
24

Wirt unter dem Fachmann bekannten Bedingungen kultiviert wird und das OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment z.B. an der Zelloberfläche exprimiert wird. Vorteilhaft an Säugetierexpressionssystemen ist, daß sie sehr gute Glykosilierungs- und Faltungsbedingungen ermöglichen. Säugerzellen, sind mit transienten Expressionssystemen, stabilen Expressionssystemen und mit viralen Expressionssystemen z. B. Vaccinia, Semliki-Forest-Virus, Adenovirus verwendbar, die kommerziell erhältlich sind. Auch transgene Tiere z. B. Kühe, Ziegen, Mäuse sind geeignet für ein erfindungsgemäßes Verfahren. Auch transgene Pflanzen wie *Nicotiana tabacum* (Tabak) sind in einem erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar. Diese eignen sich insbesondere für die Herstellung von erfindungsgemäßen OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment. Nach genomischer Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, welche für ein erfindungsgemäßes OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment kodiert, die an eine Signalsequenz fusioniert ist, kann die Oberflächenexpression des OTRPC4-Polypeptides oder -Fragmentes oder die Sekretion in den interstitiellen Raum erreicht werden.

Die Herstellung mit prokaryontischen Expressionssystemen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* oder auch *Proteus mirabilis* eignet sich bevorzugt für erfindungsgemäße OTRPC4-Fragmente, aber auch für das ganze OTRPC4-Polypeptid. Die erfindungsgemäßen OTRPC4-Polypeptide werden in einem erfindungsgemäßen Verfahren entweder bevorzugt an der Oberfläche, beispielsweise in die Außenhülle, d.h. eine der beiden bakteriellen Zellmembranen oder die Pyptidoglycanschicht der Außenhülle bei Gram-negativen Bakterien oder in die Zellmembran bei Gram-positiven Bakterien integriert, oder intrazellulär, z.B. in Inklusionskörpern oder durch periplasmatische Sekretion in Gram-negativen Bakterien mittels hierfür geeigneten Vektoren hergestellt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Antikörperprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es spezifisch für ein erfindungsgemäßes Polypeptid ist. Daher bindet das erfindungsgemäße Antikörperprotein an ein Epitop von OTRPC4 oder an ein Epitop einer der oben beschriebenen Varianten.

Für viele Anwendungen der erfindungsgemäßen Antikörper sind möglichst kleine antigenbindende, d.h. OTRPC4-bindende Einheiten wünschenswert. Daher ist in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein erfindungsgemäßes Antikörperprotein ein Fab-Fragment (Englisch „Fragment antigen-binding = Fab“). Diese erfindungsgemäßen OTRPC4-spezifischen Antikörperproteine bestehen aus den variablen Regionen beider



Boehringer Ingelheim Pharma KG

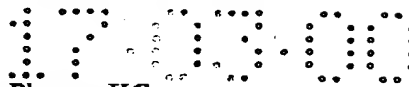
Case 1-1128

25

Ketten, die durch die anschließende konstante Region zusammengehalten werden. Diese können durch Protease-Verdau wie z.B. mit Papain aus herkömmlichen Antikörpern entstehen, ähnliche Fab-Fragmente können jedoch auch mittlerweile gentechnologisch hergestellt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes Antikörperprotein ein $F(ab')_2$ Fragment, welches durch proteolytische Spaltung mit Pepsin hergestellt werden kann.

Mit Hilfe von gentechnischen Methoden ist es möglich, verkürzte Antikörperfragmente herzustellen, die nur noch aus den variablen Regionen der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) bestehen. Diese werden als Fv-Fragmente (Englisch: „Fragment variable“ = Fragment des variablen Teils) bezeichnet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes, OTRPC4-spezifisches Antikörpermolekül ein solches Fv-Fragment. Da diesen Fv-Fragmenten die kovalente Verknüpfung beider Ketten durch die Cysteine der konstanten Ketten fehlt, werden die Fv-Fragmente oft stabilisiert. Vorteilhaft ist es, die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette durch ein kurzes Peptidstück, beispielsweise von 10 bis 30 Aminosäuren, bevorzugt 15 Aminosäuren, zu verknüpfen. Hierdurch wird ein einziger Peptidstrang aus VH und VL, verbunden durch einen Peptidlinker, erhalten. Ein solches Antikörperprotein wird als Fv-Einzelkette oder Englisch: „single-chain-Fv“ (scFv) bezeichnet. Beispiele aus dem Stand der Technik für solche scFv-Antikörperproteine sind in Huston et al. (1988, PNAS 16: 5879-5883) beschrieben. Daher ist in noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein erfindungsgemäßes, OTRPC4-spezifisches Antikörperprotein eine Fv-Einzelkettenprotein (scFv).

Es wurden in den letzten Jahren verschiedene Strategien entwickelt, um scFv als multimerere Derivate herzustellen. Dies sollte insbesondere zu rekombinanten Antikörpern mit verbesserten Pharmakokinetik- und Biodistributionseigenschaften sowie mit erhöhten Bindungsaviditäten führen. Um eine Multimerisierung der scFv zu erzielen, wurden scFv als Fusionproteine mit Multimerisierungsdomänen hergestellt. Als Multimerisierungsdomänen dienen z. B. die CH3-Region eines IgG oder *coiled coil*-Strukturen (Helix-Strukturen) wie *Leucin-zipper*-Domänen. Es gibt jedoch auch Strategien bei denen die Interaktion zwischen den VH/VL-Regionen des scFv zur Multimerisierung herangezogen werden (z. B. Di-, Tri- und Pentabodies). Daher ist in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein erfindungsgemäßes Antikörperprotein ein für ein OTRPC4-Epitop spezifisches Diabody-



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

26

Antikörperfragment. Unter Diabody versteht der Fachmann ein bivalentes homodimeres scFv-Derivat (Hu et al., 1996, PNAS 16: 5879-5883). Die Verkürzung des *Linkers* in einem scFv-Molekül auf 5- 10 Aminosäuren führt zur Bildung von Homodimeren bei denen eine inter-Ketten VH/VL-Zusammenlagerung stattfindet. Diabodies können zusätzlich durch den Einbau von Disulfidbrücken stabilisiert werden. Beispiele aus dem Stand der Technik für Diabody-Antikörperproteine finden sich bei Perisic et al. (1994, Structure 2: 1217-1226).

Unter Minibody versteht der Fachmann ein bivalentes, homodimeres scFv-Derivat. Es besteht aus einem Fusionsprotein, das die CH3-Region von einem Immunglobulin, bevorzugt IgG, ganz besonders bevorzugt IgG1 als Dimerisierungsregion enthält, die über eine *Hinge*-Region (z.B. ebenfalls von IgG1) und eine *Linker*-Region mit dem scFv verbunden ist. Die Disulfidbrücken in der *Hinge*-Region werden meist in höheren Zellen und nicht in Prokaryonten ausgebildet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes Antikörperprotein ein OTRPC4-spezifisches Minibody-Antikörperfragment. Beispiele aus dem Stand der Technik für Minibody-Antikörperproteine finden sich bei Hu et al. (1996, Cancer Res. 56: 3055-61).

Unter Triabody versteht der Fachmann ein: trivalentes homotrimeres scFv-Derivat (Kortt et al. 1997 Protein Engineering 10: 423-433). ScFv-Derivate bei denen VH-VL direkt ohne Linkersequenz fusioniert sind, führen zur Ausbildung von Trimeren.

Unter Tetraivalent Miniantibody versteht der Fachmann ein tetraivalentes homodimeres scFv-Derivat (Pack et al., 1995 J. Mol. Biol. 246: 28-34). Die Multimerisierung erfolgt durch tetramere *coiled coil*-Domäne.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Antikörperprotein vollständig human.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von einem erfindungsgemäßen Antikörperprotein, welches die folgenden Schritte umfaßt: ein Wirt ausgewählt aus einer eukaryontischen oder prokaryontischen Zelle, welcher einen oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Nukleinsäuren spezifisch für das Antikörperprotein enthält, wird unter Bedingungen, unter denen besagtes Antikörperprotein durch besagte Wirtszelle exprimiert wird, kultiviert und besagtes Antikörperprotein wird isoliert.

Die erfindungsgemäßen Antikörperproteine können in einem erfindungsgemäßen Verfahren auch in Pilzen, wie z. B. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Trichoderma* mit Vektoren, die zur intrazellulären Expression oder zur Sekretion führen,

17.03.00

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

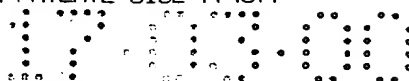
27

hergestellt werden. Auch mit Insektenzellen kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der Antikörperproteine durchgeführt werden, z. B. als transientes oder stabiles Expressionssystem oder Baculovirus-Expressionssystem, vergleichbar wie oben beschrieben. Insektenzellexpressionssysteme für die Expression von Antikörperproteinen sind kommerziell erhältlich. Insektenzellexpressionssysteme eignen sich insbesondere für die erfindungsgemäßen scFv-Fragmente und Fab- bzw. F(ab')₂-Fragmente und Antikörperproteine bzw. Fragmente hiervon, welche mit Effektormolekülen fusioniert sind, aber auch für vollständige Antikörpermoleküle.

Vorteilhaft an Säugetierexpressionssystemen ist, daß sie sehr gute Glykosilierungs- und Faltungsbedingungen ermöglichen, z.B. transiente Expressionssysteme, z. B. in COS-Zellen oder stabile Expressionssysteme z. B. BHK-, CHO-, Myelomzellen. Säugerzellen sind auch z. B. mit viralen Expressionssystemen z. B. Vaccinia, Semliki-Forest-Virus, Adenovirus verwendbar. Auch transgene Tiere z. B. Kühe, Ziegen, Mäuse sind geeignet für ein erfindungsgemäßes Verfahren. Auch transgene Pflanzen wie *Nicotiana tabacum* (Tabak) sind in einem erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar. Nach genomischer Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, welche für ein erfindungsgemäßes Antikörperprotein kodiert, die an eine Signalsequenz fusioniert ist, kann die Sekretion des Antikörperproteins in den interstitiellen Raum erreicht werden. Die Herstellung mit prokaryontischen Expressionssystemen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* oder auch *Proteus mirabilis* eignet sich bevorzugt für erfindungsgemäße Antikörperfragmente, wie Fab-, F(ab')₂-, scFv-Fragmente, Minibodies, Diabodies und Multimere besagter Fragmente. Die Erfindungsgemäßen Antikörperproteine werden in einem erfindungsgemäßen Verfahren entweder intrazellulär, z.B. in Inklusionskörpern oder durch periplasmatische Sekretion in Gram-negativen Bakterien mittels hierfür geeigneten Vektoren hergestellt.

Ebenfalls von der Erfindung umfaßt ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptides zum Auffinden von Blocker, Aktivatoren oder Modulatoren besagter Polypeptide.

Unter Blocker sind Substanzen zu verstehen, die durch Bindung an den OTRPC4-Kationenkanal selbst, durch Bindung an regulatorische Untereinheiten oder durch Interaktion mit der Zellmembran oder Teilen derselben die Ionenpermeabilität des Kanals hemmen.



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

28

Unter Aktivatoren sind Substanzen zu verstehen, die durch Bindung an den OTRPC4-Kationenkanal selbst, durch Bindung an regulatorische Untereinheiten oder durch Interaktion mit der Zellmembran oder Teilen derselben die Ionenpermeabilität des Kanals stimulieren.

- 5 Unter Modulatoren sind Substanzen zu verstehen, die durch Bindung an den OTRPC4-Kationenkanal selbst, durch Bindung an regulatorische Untereinheiten oder durch Interaktion mit der Zellmembran oder Teilen derselben die Ionenpermeabilität des Kanals verändern, z.B. die Selektivität des Kanals gegenüber von Kalzium und Natrium verändern. Blocker, Aktivatoren oder Modulatoren können ihre jeweilige pharmakologische
- 10 Eigenschaften entfalten abhängig von physikalischen Einflüssen, wie z.B. pH, Temperatur und Ionenkonzentrationen des intra- oder extrazellulären Milieus oder auch abhängig von dem Aktivierungszustand des Kanals.

Weiterhin von der Erfindung umfaßt ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Wirtes zum Auffinden von Blocker, Aktivatoren oder Modulatoren von OTRPC4-Kanälen.

- 15 Ein weiterer, bevorzugter Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Auffinden von Blocker, Aktivatoren oder Modulatoren von OTRPC4, dadurch gekennzeichnet, daß ein erfindungsgemäßer Wirt mit einer Testsubstanz inkubiert wird.

Ein weiterer, ganz besonders bevorzugter Aspekt der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß ein Membranstrom gemessen wird, besagter

- 20 Membranstrom mit einem Membranstrom verglichen wird, der bei besagtem Wirt nach Inkubation mit einer bekannten Kontrollsubstanz oder in Abwesenheit der Testsubstanz gemessen wird. Ein solches Verfahren ist exemplarisch in Beispiel 1, Abbildung 7 der Erfindung beschrieben.

Ein weiterer, ganz besonders bevorzugter Aspekt der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes

- 25 Verfahren worin besagter Aktivator an einen Kanal gebunden ist, besagter Wirt mit einer Testsubstanz inkubiert wird und die Verdrängung des an den Kanal gebundenen Aktivator durch die Testsubstanz gemessen wird.

Ein weiterer, ganz besonders bevorzugter Aspekt der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, worin ein erfindungsgemäßer Wirt mit einer Testsubstanz inkubiert wird, die

30 intrazelluläre Menge eines divalenten Kationes bestimmt wird und besagte Menge des divalenten Kationes mit der Menge besagten divalenten Kationes verglichen wird, die bei der Inkubation besagten Wirtes mit einer bekannten Kontrolle oder in der Abwesenheit der

17.03.00

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

29

Testsubstanz gemessen wird. Ein solches Verfahren ist exemplarisch in Beispiel 1 der Erfindung beschrieben.

Ein weiterer, ganz besonders bevorzugter Aspekt der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, welches ein Hochdurchsatzmusterungstest (Englisch: „high throughput screening = HTS“) oder ein Ultrahochdurchsatzmusterungstest (Hochdurchsatzmusterungstest (Englisch: „ultra high throughput screening = UHTS“) ist. HTS bezieht sich im Rahmen der Erfindung auf ein experimentelles Verfahren, bei dem eine große Anzahl an Testsubstanzen gleichzeitig getestet werden. Vorzugsweise wird ein HTS-Verfahren in Mikrotiterplatten ausgeführt, teilweise oder vollständig automatisiert und an elektronische Geräte wie z.B. Computer zur Datenspeicherung, -Analyse und Interpretation mittels Bioinformatik angeschlossen. Bevorzugt werden zur Automatisierung Roboter eingesetzt, die eine große Anzahl von Mikrotiterplatten gleichzeitig handhaben können und mehrere tausend Tests pro Tag ausführen können. Vorzugsweise wird eine Testsubstanz auf eine erwünschte Aktivator-, Blocker- oder Modulatorfunktion in einem zellbasierten System mit einer erfindungsgemäßen Zelle getestet. Der Ausdruck HTS umfaßt auch Ultrahochdurchsatzmusterungstests (UHTS). Vorzugsweise werden besagte UHTS-Verfahren unter Verwendung von 384- oder 1536-Loch-Mikrotiterplatten, Submikroliter- und Subnanoliterpipettoren, verbesserten Plattenlesegeräten und Verfahren um Verdunstung zu verhindern, ausgeführt. HTS Verfahren sind beispielhaft in den Patenten US 5876946 A oder US 5902732 A beschrieben. Der Durchschnittsfachmann kann die oben und in den Beispielen beschriebenen Verfahren an ein HTS oder UHTS Format anpassen, ohne selbst erfinderisch tätig zu sein.

Ein HTS zur Identifizierung von Blockern, Aktivatoren oder Modulatoren des OTRPC4-Kanals kann erfolgen, wie in Beispiel 1 beschrieben, kann aber auch mit sogenannten induzierbaren Expressionssystemen durchgeführt werden, beispielsweise ein durch Tetracyclin induzierbares Plasmid (Gossen M, Bonin AL, Freundlieb S, Bujard H: Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. Curr Opin Biotechnol 1994, 5, 516-20) oder ein durch den Ecdyson-Rezeptor induzierbares System (Invitrogen). Diese Systeme, aber auch andere, sind kommerziell erhältlich.

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Aktivator von OTRPC4, auffindbar mit einem erfindungsgemäßen Verfahren.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

30

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Blocker von OTRPC4, auffindbar mit einem erfindungsgemäßen Verfahren.

Noch ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Modulator von OTRPC4, auffindbar mit einem erfindungsgemäßen Verfahren.

- 5 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfaßt eine Anti-Sinn-Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie an einen Teil einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann.

Unter Anti-Sinn-Nukleinsäure (Englisch: „anti-sense nucleic acid“ oder auch „anti-sense oligonucleotide“) werden DNS oder RNS-Moleküle im Rahmen dieser Erfindung
10 verstanden, die komplementär zu zumindest einem Teil eines erfindungsgemäßen, d.h. für ein OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment kodierenden mRNS Molekül sind. Eine Definition von Anti-Sinn-Nukleinsäure findet sich auch im Stand der Technik (Weintraub HM, 1990 Scientific American, 262, 34-40). In der Zelle hybridisieren Anti-Sinn-Nukleinsäuremoleküle an die Korrespondierende mRNS und bilden ein
15 Doppelstrangmolekül. Die erfindungsgemäßen Anti-Sinn-Nukleinsäuren interferieren mit der Translation der für OTRPC4-Polypeptid oder ein OTRPC4-Fragment kodierenden mRNS, da die Zelle besagte doppelsträngige mRNS nicht translatieren wird. Die zentrale Region der Anti-Sinn-Nukleinsäure im Rahmen dieser Erfindung enthält mindestens 14 Nukleotide, die komplementär zu der Ziel-RNS sind. Die Erfindung umfaßt auch Peptid-
20 Nukleinsäuren, Phosphodiester-Anti-Sinn-Nukleinsäuren und Phosphothioat-Oligonukleotide, die komplementär zu zumindest einem Teil eines erfindungsgemäßen für ein OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment kodierenden mRNS Molekül sind. Solche für andere Ziel-RNS spezifischen Substanzen sind aus dem Stand der Technik bekannt (Boado RJ et al., 1998 J Pharm Sci 87: 1308-1315.).

- 25 In Beispiel 1 (Tabelle 1) sind fünf Anti-Sinn-Sequenzen beispielhaft aufgeführt und die Kriterien, die zu der Auswahl dieser Sequenzen führten, dargestellt.

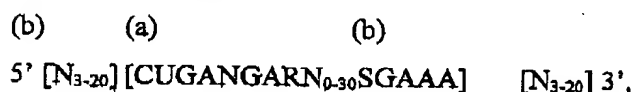
Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfaßt eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-Nukleinsäure, die ein Ribozym ist. Ribozym im Rahmen dieser Erfindung ist ein RNS-Molekül, das spezifisch mit der Ziel-RNS, d.h. der erfindungsgemäßen für ein
30 OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment kodierenden mRNS interagieren und diese irreversibel an einer spezifischen Stelle schneiden kann. Vorzugsweise besitzt das erfindungsgemäße Ribozym eine zentrale Sequenz, die zur Ziel-RNS nicht komplementär ist und für dessen

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

31

katalytische Aktivität verantwortlich ist (katalytischer Bereich (a)) und zwei flankierende Sequenzen, die zu zwei benachbarten Sequenzen der Ziel-RNS im wesentlichen komplementär sind (Hybridisierungsbereich (b)), so die Bindung des Ribozyms über Basenpaarung und dadurch die selektive Spaltung der Ziel-RNS erlauben. Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Ribozyms kann durch folgende generelle Formel dargestellt werden:



worin N ein G, C, A oder U, R ein Purin und S ein Pyrimidin ist und worin die zentrale Region N_{0-30} der Sequenz (a) durch einen Linker ersetzt werden kann, der keine Nukleinsäure ist, nämlich beispielsweise eine Kohlenwasserstoffkette (s.a. Thomson et al., 1993, Nucleic Acids Res 21, 5600-5603.). Die erfindungsgemäßen Ribozyme können beispielsweise ein „Hammerhead“- „Hairpin“- oder „Axehead“-Ribozym sein. Die Struktur von „Hammerhead“-Ribozymen ist dem Fachmann bekannt und auch beispielhaft in Symons RH (1992, Annu Rev Biochem 61, 641-671) bzw. Rossi JJ (1993, Methods 5, 1-5.) beschrieben. „Hairpin“ Ribozyme können Ziel-RNS wirksam in trans spalten, wobei der Wirkmechanismus ähnlich dem „Hammerhead“ Ribozym ist (s. a. Rossi, *supra*, und Hampel et al., 1990, Nucleic Acids Res 18, 299-304.). Auch „Axehead“-Ribozyme können wirksam in trans spalten. Sie sind beispielsweise in Been MD et al., (1994 Trends Biochem Sci 19, 251-256) und Wu HN et al. (1993, Nucleic Acids Res 21, 4193-4199) beschrieben. Der Fachmann kann anhand der aus dem Stand der Technik bekannten Daten die für die Spaltung erforderlichen Minimalsequenzen bzw. -struktur ermitteln und Ribozyme konstruieren, die die für die Zwecke der Erfindung erforderlichen Eigenschaften aufweisen. Besagtes Ribozym kann auch im Rahmen der Erfindung modifiziert werden, um eine erhöhte Nukleasenresistenz zu erhalten. Beispiele hierfür sind die Substitution der 2'-OH Gruppen der Ribose durch 2'-H, 2'-O-methyl, 2'-O-allyl, 2'-Fluor or 2'-Aminogruppen (Paoletta et al., 1992, und Pieken et al., 1991) oder die Modifikation von Phosphodiesterbindungen, z.B. indem ein oder zwei Sauerstoffatome gegen Schwefel ausgetauscht werden (Phosphorthioat bzw. Phosphordithioat; Eckstein, 1985, und Beaton et al., in: Eckstein, F. (Hrsg.) Oligonucleotides and analogues - A practical approach - Oxford, JRL Press (1991), 109-135) bzw. durch eine Methylgruppe (Methylphosphonat; Miller, ebenda, 137-154). Weitere Modifikationen umfassen die Konjugation der RNS mit

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

32

poly-L-Lysin, Polyalkylderivaten, Cholesterin oder PEG. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Ribozyme mindestens eine der vorstehend beschriebenen Phosphatmodifikationen und/oder mindestens eine der vorstehend beschriebenen Ribosemodifikationen.

5 Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-Nukleinsäure sowie pharmazeutisch akzeptable
10 Träger- oder Hilfsstoffe enthält.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.

Pharmazeutisch akzeptable Trägerstoffe oder Hilfsstoffe in dieser Erfindung können
15 physiologisch akzeptable Verbindungen sein, die beispielsweise die Absorption von OTRPC4-Aktivator, -Blocker oder -Modulatoren stabilisieren oder verbessern. Solche physiologisch akzeptable Verbindungen umfassen beispielsweise Kohlenhydrate wie Glukose, Sucrose oder Dextrane, Antioxidantien, wie Ascorbinsäure oder Glutathion, Chelatbildner, niedermolekulare Verbindungen oder andere Stabilisatoren oder Hilfsstoffe
20 (s. a. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Auflage, Mack Publ., Easton.). Der Fachmann weiß, daß die Auswahl eines pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoffes z.B. von der Administrationsroute der Verbindung abhängig.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die einen erfindungsgemäßen Vektor sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder
25 Hilfsstoffe enthält. Die besagte pharmazeutische Zusammensetzung kann auch einen erfindungsgemäßen Vektor für die Gentherapie enthalten und kann zusätzlich als Hilfsstoff ein kolloidales Dispersionssystem oder Liposomen für eine zielgerichtete Applikation der pharmazeutischen Zusammensetzung umfassen.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung,
30 die einen erfindungsgemäßen Wirt sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält. Auch ein Wirt oder eine Wirtszelle, die einen erfindungsgemäßen Vektor

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

33

enthält, kann in einer pharmazeutischen Zusammensetzung im Rahmen dieser Erfindung, beispielsweise zur Gentherapie, verwendet werden.

Ein Beispiel für ein zielgerichtetes Applikationssystem, z.B. für erfindungsgemäße Anti-Sinn-Oligonukleotide oder Ribozyme ist besagtes kolloidales Dispersionssystem. Kolloidale Dispersionssysteme umfassen Makromolekülkomplexe, Nanokapseln, Kügelchen und Lipid-basierte Systeme einschließlich Öl-in-Wasser Emulsionen, Mizellen, gemischte Mizellen und Liposomen oder Liposom-Formulierungen. Das bevorzugte kolloidale System der Erfindung sind Liposomen. Liposomen sind artifizielle Membranvesikel, die als Vehikel in vitro und in vivo nützlich sind. Diese Formulierungen können kationische, anionische oder neutrale Ladung tragen. Es wurde gezeigt, daß große unilamellare Vesikel („large unilamellar vesicles“ LUV), die eine Größe von 0.2-4.0 µm haben, einen Großteil einer wässrigen Pufferlösung mit großen Makromolekülen umschließen können. RNS, DNS und intakte Virione können in die wässrige Phase im Inneren eingekapselt werden und in einer biologisch aktiven Form an das Ziel transportiert werden (Fraley R et al., 1981, Trends Biochem Sci 6, 77-80). Neben Säugerzellen haben sich Liposomen auch für den zielgerichteten Transport von Nukleotiden in pflanzlichen-, Hefe- und bakteriellen Zellen als geeignet erwiesen. Um ein effizientes Gentransfervehikel zu sein, sollten die folgenden Eigenschaften vorhanden sein: (1) die Gene sollten mit einer hohen Effizienz eingeschlossen werden, ohne dabei ihre biologische Aktivität zu verringern; (2) es sollte präferentielle und substantielle Bindung an die Zielzelle im Vergleich zu nicht-Zielzellen erfolgen; (3) die wässrige Phase des Vehikels sollte mit hoher Effizienz in das Zielzellzytoplasma transferiert werden; und (4) die genetische Information sollte akkurat und effizient exprimiert werden (Mannino RJ et al., 1988, BioTechniques 6, 682-690).

Die Zusammensetzung der Liposomen besteht üblicherweise aus einer Kombination von Phospholipiden, insbesondere Hoch-Phase-Übergangstemperatur-Phospholipide (Englisch "high-phase-transition-temperature"), z.B. in Kombination mit Steroiden, z.B. Cholesterin. Andere Phospholipide oder andere Lipide können auch verwendet werden. Die physikalischen Charakteristika der Liposomen hängen vom dem pH, der Ionenkonzentration und der Gegenwart divalenter Kationen ab.

Die pharmazeutische Zusammensetzung der gegenwärtigen Erfindung kann auch einen erfindungsgemäßen Vektor als nackten „Genexpressionsvektor“ enthalten. Dies bedeutet, der erfindungsgemäße Vektor ist nicht mit einem Hilfsstoff für zielgerichtete Applikation

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

34

assoziiert (z.B. Liposomen, kolloidale Partikel etc.). Ein prinzipieller Vorteil von nackten DNS-Vektoren ist das Fehlen einer Immunantwort, die durch den Vektor selbst hervorgerufen wird.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, Schock sowie weiteren pathophysiologischen Zuständen, die durch Hyper- und Hypoosmolarität charakterisiert sind. Dies sind beispielsweise andere pathophysiologische Zustände, die mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität einhergehen, wie z.B. Schockzustände unterschiedlicher Genese, wie z.B. kardiogener, metabolischer, septischer, anaphylaktischer Schock oder Schockzustände ausgelöst durch Verbrennungen oder Polytraumata.

Unter Schock wird im Rahmen dieser Erfindung ein pathophysiologischer Zustand verstanden, der zu einer generalisierten schwerwiegenden Reduktion der Gewebepfusion und einer konsekutiven Gewebeschädigung führt.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-Nukleinsäure zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz und und Schock. Dies sind beispielsweise andere pathophysiologische Zustände, die mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität einhergehen, wie z.B. Schockzustände unterschiedlicher Genese, wie z.B. kardiogener, metabolischer, septischer, anaphylaktischer Schock oder Schockzustände ausgelöst durch Verbrennungen oder Polytraumata.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz und und Schock. Dies sind beispielsweise andere pathophysiologische Zustände, die mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität einhergehen, wie z.B. Schockzustände unterschiedlicher Genese, wie z.B. kardiogener, metabolischer, septischer, anaphylaktischer Schock oder Schockzustände ausgelöst durch Verbrennungen oder Polytraumata.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

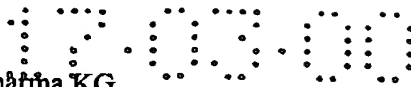
Case 1-1128

35

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Wirts zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz und und Schock. Dies sind beispielsweise andere pathophysiologische Zustände, die mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität einhergehen, wie z.B. Schockzustände unterschiedlicher Genese, wie z.B. kardiogener, metabolischer, septischer, anaphylaktischer Schock oder Schockzustände ausgelöst durch Verbrennungen oder Polytraumata.

Noch ein wesentlicher Aspekt der Erfindung ist ein nicht menschlicher Säuger, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich zu seinem Genom eine erfindungsgemäße Nukleinsäure (Transgen) enthält. Hierunter wird ein nicht menschliches, transgenes Säugetier verstanden, das zusätzlich zu seinem Genom eine erfindungsgemäße für OTRPC4 bzw. ein Fragment hiervon kodierende Nukleinsäuresequenz stabil in einen Teil seiner Körperzellen (Chimäre) oder in alle Körperzellen integriert hat und das OTRPC4-Polypeptid bzw. Fragment exprimiert. Dem Fachmann sind transgene Säugetiere bekannt, die für andere Sequenzen transgen sind (s.a. Schenkel, J., Spektrum Akad. Verl., 1995). Erfindungsgemäße transgene Säuger sind beispielsweise transgene Nagetiere, wie Ratten, Mäuse und Hamster, aber auch Ziegen, Rinder, Schweine, Schafe sowie weitere dem Fachmann bekannte nicht menschliche Säuger. Ganz besonders bevorzugt sind Mäuse.

Noch ein wesentlicher Aspekt der Erfindung ist ein nicht menschlicher Säuger, dadurch gekennzeichnet, daß in seinem Genom eine erfindungsgemäße Nukleinsäure inaktiviert (Gen-Knock-out) ist. Hierunter wird ein nicht menschliches, sog. Knock-out Säugetier verstanden, in dessen Genom die einer erfindungsgemäßen, für OTRPC4 bzw. ein Fragment hiervon kodierende Nukleinsäuresequenz entsprechende endogene Nukleinsäuresequenz inaktiviert ist und in der kein oder nur geringe Mengen an OTRPC4-Polypeptid bzw. Fragment hiervon exprimiert werden. Geringe Mengen bedeutet, daß die Expression von OTRPC4-Polypeptid oder -Fragment um mindestens 50%, bevorzugt über 50 bis 80%, besonders bevorzugt über 80 bis 100% gegenüber vergleichbaren, nicht knock-out Säugern reduziert ist. Die Inaktivierung erfolgt oft durch Einklonierung einer Reportersequenz, beispielsweise des Gens für Neomycinresistenz. Dem Fachmann sind weitere knock-out Säugetiere bekannt, bei denen andere Sequenzen inaktiviert sind. Erfindungsgemäße knock-out Säuger sind beispielsweise knock-out Nagetiere, wie Ratten, Mäuse und Hamster, aber



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

36

auch Ziegen, Rinder, Schweine, Schafe sowie weitere dem Fachmann bekannte nicht menschliche Säuger. Ganz besonders bevorzugt sind Mäuse. Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Knock-out Säugers sind unten beschrieben. Die Konstruktion eines rekombinanten Vektors für einen konditionellen Knock-out ist exemplarisch in Beispiel 1 beschrieben.

Noch ein wesentlicher Aspekt der Erfindung ist ein nicht menschlicher Säuger, dadurch gekennzeichnet, daß in seinem Genom eine erfindungsgemäße Nukleinsäure modifiziert (Gen-Knock-in) ist. Diese Modifikation kann mittels homologer Rekombination der kodierenden Nukleinsäure erfolgen und führt dazu, daß in diesem Säuger beispielsweise ein OTRPC4-Polypeptid bzw. Fragment hiervon mit veränderten Eigenschaften exprimiert wird. Dies kann z.B. durch eine Mutation in einem kleinen Teil der kodierenden Nukleinsäure erfolgen. Erfindungsgemäße knock-out Säuger sind beispielsweise Knock-in Nagetiere, wie Ratten, Mäuse und Hamster, aber auch Ziegen, Rinder, Schweine, Schafe sowie weitere dem Fachmann bekannte nicht menschliche Säuger. Ganz besonders bevorzugt sind Mäuse. Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Knock-in Säugers sind unten beschrieben.

Die erfindungsgemäßen nicht menschlichen transgenen bzw. knock-out bzw. knock-in Säuger eignen sich hervorragend, die Funktion des OTRPC4-Genes bzw. -Polypeptides zu analysieren. Hierbei können jeweils die erfindungsgemäßen Säuger mit Säugern derselben Spezies oder vorteilhafterweise desselben Wurfes („littermates“) verglichen werden und dadurch die Funktion des erfindungsgemäßen Polypeptides untersucht werden.

Ebenso von der Erfindung umfaßt sind Verfahren zur Herstellung eines nicht menschlichen Säugers, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) embryonale Stammzellen des besagten nicht menschlichen Säugetiers mit einem Vektor transfiziert werden, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure sowie eine Rekombination zwischen der genomischen DNA, des besagten nicht menschlichen Säugetieres und der im Vektor enthaltenen Nukleinsäure ermöglicht
- b) stabil transfizierte Stammzellen aus Schritt a) isoliert werden und diese in die Keimbahn eines weiblichen Tieres des besagten nicht menschlichen Säugetieres überführt werden

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

37

- c) die Nachkommen des besagten weiblichen Tieres aus Schritt b) mit einem männlichen Tier derselben Art werden auf Tiere, die das durch die Nukleinsäure aus Schritt a) kodierte Polypeptid exprimieren, analysiert.

Embryonale Stammzellen (ES) lassen sich durch Kultivierung der inneren Zellmasse von Blastozysten gewinnen und in Gewebekultur vermehren. Zum Zwecke der Erfindung wird die Differenzierung der Stammzellen verhindert, in dem man sie auf Nährzellen aus Fibroblasten kultiviert oder dem Kulturmedium Leukämie-inhibierenden-Faktor (LIF) zusetzt. Das Einschleußen von erfindungsgemäßer Nukleinsäure in ES Zellen, beispielsweise DNS kodierend für OTRPC4 oder ein Fragment hiervon wird beispielsweise mittels Transfektion, Retrovirusinfektion oder Elektroporation durchgeführt. Ein solcher Vektor trägt beispielsweise das Neomycin-Gen, das Resistenz gegenüber G418 verleiht. Damit können erfolgreich transfizierte embryonale Stammzellen identifiziert werden, indem dem Kulturmedium G418 zugesetzt wird. Nur erfolgreich transfizierte ES können unter diesen Bedingungen wachsen. Solche transfizierte ES werden beispielsweise in Blastozysten wieder überführt und diese werden in die Keimbahn eines weiblichen erfindungsgemäßen Säugers überführt. Die mutierten Zellen werden in den sich entwickelnden Embryo integriert und nehmen an der Entwicklung aller Gewebe teil. Hierdurch gelangt das erfindungsgemäße Transgen in die Keimbahn. Es bilden sich chimäre Tiere, die z.B. durch vorherige Auswahl von ES-Zellen und Empfängerblastozysten von Tieren unterschiedlicher Fellfarbe charakterisiert werden können. Durch mehrfache Züchtung der chimären Tiere erhält man homozygote Tiere, die das Transgen in jedem Gewebe exprimieren.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung von nicht menschlichen transgenen Säugern umfaßt die Isolierung von befruchteten Eizellen, die Mikroinjektion von erfindungsgemäßer, für OTRPC4 oder ein Fragment hiervon kodierender Nukleinsäure, die Implantation besagter befruchteter Eizellen in die Keimbahn eines pseudoschwangeren, weiblichen Tieres besagten nicht menschlichen Säugers und die Untersuchung der Nachkommen besagten weiblichen Tieres mit einem männlichen Tier derselben Art auf Expression des Transgenes. Die durch Mikroinjektion eingebrachte Nukleinsäure, bevorzugt DNS, integriert sich oft an anderer Stelle als die vergleichbare endogene Nukleinsäure, wird meist jedoch genauso exprimiert. Besagte erfindungsgemäße Nukleinsäure kann in einer, aber auch in zahlreichen, d.h. 2 bis mehreren hundert oder tausenden Kopien in das Genom

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

38

integriert sein. Details zu Verfahren zur Herstellung von transgenen, nicht-menschlichen Säugern sind dem Fachmann bekannt (s.a. Schenkel, J., Spektrum Akad. Verl., 1995).

Ebenso von der Erfindung umfaßt sind Verfahren zur Herstellung eines nicht menschlichen Säugers, dadurch gekennzeichnet, daß

- d) embryonale Stammzellen des besagten nicht menschlichen Säugetiers mit einem Vektor transfiziert werden, der eine Nukleinsäure enthält, die an eine erfindungsgemäße Nukleinsäure unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, und durch Insertion einer zusätzlichen Nukleinsäuresequenz inaktiviert ist, sowie eine Rekombination zwischen der genomischen DNA des besagten nicht menschlichen Säugetieres und der im Vektor enthaltenen Nukleinsäure ermöglicht
- e) stabil transfizierte Stammzellen aus Schritt d) isoliert werden und diese in die Keimbahn eines weiblichen Tieres des besagten nicht menschlichen Säugetieres überführt werden.
- f) die Nachkommen des besagten weiblichen Tieres aus Schritt e) mit einem männlichen Tier derselben Art werden auf Tiere, die das durch die Nukleinsäure aus Schritt d) kodierte Polypeptid exprimieren, analysiert.

Um einen erfindungsgemäßen Säuger herzustellen, bei dem das endogene Gen, das einer erfindungsgemäßen OTRPC4 Nukleinsäuresequenz entspricht oder eine solche umfaßt, durch sogenanntes knock-out inaktiviert ist, wird besagtes Gen durch homologe Rekombination angesteuert und inaktiviert. Unter homologer Rekombination versteht der Fachmann Verfahren, die es ermöglichen, Nukleinsäure z.B. DNS gezielt in Gene einzubauen. Eine klonierte Kopie des endogenen Genes wird durch eine funktionslose Kopie ersetzt. Beispielsweise wird die eingeschleuste Kopie durch eine eingefügte Kopie eines oder mehrerer Antibiotikumresistenzgene(s) unterbrochen, was zur Inaktivierung führt. Beispielsweise kann die Sequenz für das Zielgen durch das Neomycinresistenzgen unterbrochen sein. Beispielsweise durch Einbringen Herpes-simplex Virus Thymidinkinase (HSV-tk), z.B. am Ende des Konstruktes, können diejenigen Zellen identifiziert werden, bei denen homologe Rekombination stattgefunden hat. Im Rahmen der Erfindung wird eine in einen geeigneten Vektor klonierte, inaktivierte Kopie einer für OTRPC4 oder ein Fragment hiervon kodierender Nukleinsäure in embryonale Stammzellen (wie oben beschrieben) mit einer geeigneten Methode, d.h. durch Transfektion, Retrovirusinfektion oder Elektroporation in die ES eingeschleust. Die eingeschleuste Nukleinsäure geht in einem Teil

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

39

der ES mit der entsprechenden zellulären Kopie des OTRPC4 Genes eine homologe Rekombination ein und ersetzt das Gen durch die erfindungsgemäße, eingeführte Nukleinsäure. Beispielsweise können mittels des Antibiotikums G418 und der antiviralen Substanz Ganciclovir diejenigen ES identifiziert werden, bei denen homologe Rekombination stattgefunden hat. ES, bei denen homologe Rekombination erfolgt ist, werden in eine Blastozyste injiziert, die in den Uterus eines weiblichen nicht menschlichen Säugers der selben Art wie der ES eingesetzt. Es bilden sich chimäre Tiere, die z.B. durch vorherige Auswahl von ES-Zellen und Empfängerblastozysten von Tieren unterschiedlicher Fellfarbe charakterisiert werden können. Durch mehrfache Züchtung der chimären Tiere erhält man homozygote Tiere, bei denen das Zielgen vollständig in jedem Gewebe inaktiviert ist.

Ebenso von der Erfindung umfaßt sind Verfahren zur Herstellung eines nicht menschlichen Säugers, dadurch gekennzeichnet, daß

g) embryonale Stammzellen des besagten nicht menschlichen Säugetiers mit einem Vektor transfiziert werden, der eine Nukleinsäure enthält, die an eine erfindungsgemäße Nukleinsäure unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, und durch Insertion einer zusätzlichen Nukleinsäuresequenz modifiziert ist, sowie eine Rekombination zwischen der genomischen DNA des besagten nicht menschlichen Säugetieres und der im Vektor enthaltenen Nukleinsäure ermöglicht

h) stabil transfizierte Stammzellen aus Schritt g) isoliert werden und diese in die Keimbahn ein weibliches Tier des besagten nicht menschlichen Säugetieres überführt werden

i) die Nachkommen des besagten weiblichen Tieres aus Schritt h) mit einem männlichen Tier derselben Art werden auf Tiere, die das durch die Nukleinsäure aus Schritt g) kodierte Polypeptid exprimieren, analysiert.

Das Verfahren zur Herstellung von Knock-in Tieren wird in Anlehnung an das Verfahren zur Herstellung von Knock-out Tieren durchgeführt mit dem Unterschied, daß das Zielgen nicht inaktiviert, sondern modifiziert wird.

Das folgende Beispiel soll dem Verständnis der Erfindung dienen und in keiner Weise als limitierend für die Breite der Erfindung angesehen werden.

Beispiel 1

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

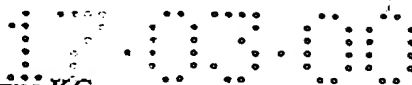
40

Struktur eines OTRPC4-Kanals

Im nachfolgenden Beispiel wird exemplarisch die Klonierung und Struktur eines erfindungsgemäßen OTRPC4-Polypeptides bzw. OTRPC4-Kationenkanals beschrieben. Die Beschreibung bzw. Verwendung des Begriffes OTRPC4-DNA, -RNA, Protein oder -Kanal soll in keiner Weise limitierend für die Breite der Erfindung gesehen werden, sondern nur dazu dienen, die Erfindung näher zu illustrieren. Weitere OTRPC4-DNA, -RNA, -Proteine oder -Kanäle sind in der Beschreibung dargestellt.

10 Die mRNA-Expression wurde durch Northern-Blot-Hybridisierungen mit EST-Fragmenten (Englisch EST = „expressed sequence tag“) AA139413 und W53556 untersucht. (hinterlegt in der Genbank). Ein RNA-Trankript einer Länge von 3,3 kb vor allem in Leber, Herz, Niere und Testis exprimiert wird, wurde identifiziert (Abbildung 1b). Aus der aus der Niere einer Maus aufgereinigten RNA wurde mit Hilfe der RACE-PCR-Methode eine cDNA
15 kloniert mit einer Länge von 3277 bp, die einen offenen Leserahmen von 2616 bp enthält (siehe erfindungsgemäße Sequenzen, supra und Ansprüche 19 und 20). Die genomische Organisation der murine Sequenz von OTRPC4 wurde durch Sequenzierung der Intron-Exon-Übergänge geklärt und ist beispielhaft in Abbildung 2 dargestellt. In situ Hybridisierungen mit einem Fragment aus dem kodierenden Bereich der OTRPC4-DNA
20 zeigten eine hohe Expression der OTRPC4-RNA im distalen Konvolut der Niere, aber auch Plexus choroideus in den Hirnventrikeln (Abbildung 3).

Die cDNA von OTRPC4 wurde in ein eukaryotisches Expressionsplasmid kloniert, das C-terminal ein GFP-Fusionsanteil (GFP=„green fluorescent protein“ grün fluoreszierendes Protein) enthält (pEGFP-N1). Dieses Plasmid wurde für die nachfolgenden
25 Expressionsstudien verwendet. Von der Nukleotidsequenz kann abgeleitet werden, daß das OTRPC4-Protein beispielsweise aus 871 Aminosäuren bestehen kann und sechs mögliche transmembranäre Segmente enthält mit einer Sequenz, zwischen Segment 5 und 6, die möglicherweise für eine Porenregion eines Kanals kodiert (Abbildung 1a). Nach transienter Transfektion (die mit Hilfe des FuGENE 6 Transfektionsreagenz durchgeführt wurde) des
30 Expressionplasids kodierend für das OTRPC4-GFP-Fusionprotein in HEK293-Zellen konnte 24–36 Stunden später eine gepunktete Fluoreszenz in der Plasmamembran festgestellt werden. Damit konnte der Nachweis erbracht werden, daß das GFP-



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

41

Fusionsprotein und damit das OTRPC4-Kanal-Protein exprimiert wird und in die Plasmamembran eingebaut wird.

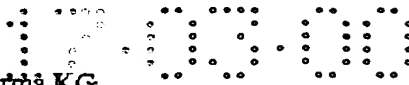
Für die nachfolgenden Experimenten wurden HEK293-Zellen mit dem oben genannten OTRPC4-enhaltenden Expressionsplasmid transient transfiziert und 24-36 Stunden später zu nicht transfizierten Kontrollzellen verglichen.

Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen, die den OTRPC4-Kanal exprimieren

Um die Funktion des OTRPC4-Kanales zu studieren wurden HEK293-Zellen transient mit Expressionsplasmid, das das OTRPC4-GFP-Fusion Konstrukt enthielt, transfiziert und anschließend die Konzentration der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) mit Hilfe der FURA-2-Methode unter Verwendung eines monochromatischen Einzelzellkalziummessplatzes gemessen (Abbildung 4). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ in OTRPC4-exprimierenden Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht (94 ± 11 nM; 50 Zellen gemessen in drei unabhängigen Experimenten versus 41 ± 3 nM; 63 Zellen gemessen in drei unabhängigen Experimenten). Um nachzuweisen, daß die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch einen Einstrom von extrazellulären Kalzium bedingt ist, wurden sog. Mangan-Quench-Experimente durchgeführt, die ergaben, daß das FURA-2-Signal durch Zugabe von 200 nM Mangan zur extrazellulären Lösung gehemmt wurde. Zusätzlich führte das Weglassen des Kalziums aus der extrazellulären Lösung eine Hemmung des basal erhöhten FURA-2-Signals (siehe Abbildung 4). Beide Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei OTRPC4 um einen Kalzium-durchlässigen Kationenkanal der Membran handelt.

Die OTRPC4-vermittelte Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist abhängig von der Osmolarität der extrazellulären Lösung

Der Einfluß der extrazellulären Osmolarität auf die Kanalaktivität von OTRPC4 wurde untersucht. Nach Verringerung der Osmolarität der extrazellulären Lösung konnte eine langer, transients und reversibler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den OTRPC4 exprimierenden, aber nicht in den Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 5). Erhöhung der Osmolarität der extrazellulären Lösung hingegen verminderte $[Ca^{2+}]_i$ (siehe kleine Abbildung in Abbildung 4). Eine signifikante Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde bereits bei einer Änderung der Osmolarität der extrazellulären Lösung um 30 mosmol/l beobachtet. Die Änderungen der



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

42

[Ca²⁺]_i, ausgelöst durch Veränderung der Osmolarität der extrazellulären Lösung, erfolgte schnell und erreichte ihr Maximum nach ca. 30 Sekunden, variierten allerdings von Zelle zu Zelle (siehe Abbildung 4). Nach Rückkehr zu normoosmolaren Lösung kehrte [Ca²⁺]_i schnell wieder zu dem Basalwert zurück. Um zwischen einem Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Medium und einer Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeicher zu unterscheiden, wurde im extrazellulären Medium Kalzium durch EGTA ersetzt, während die Zellen einem hypotonen Medium ausgesetzt wurden. Unter diesen Bedingungen kehrte das FURA-2 Signal auf den Basalwert zurück (siehe Abbildung 4). Wurden die intrazellulären Speicher durch vorherige Zugabe von Thapsigargin (5 µM), einem Hemmer der Kalzium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums, (23) entleert, änderte dies nicht an der Amplitude des FURA-2 Signals, ausgelöst durch hypotones Medium.

Diese beiden Ergebnisse belegen, daß in den OTRPC4-exprimierenden Zellen ein Kanal in der Membran exprimiert wird, der für einen osmotisch regulierten Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Medium verantwortlich ist. Von den beiden Lanthaniden Gd³⁺ und La³⁺, die die meisten kalziumpermeablen Kationenkanäle blockieren (siehe Ref. 11, 14, 24-26), hemmte LaCl₃ bei einer Konzentration von 100 µM den durch Hypoosmolarität ausgelösten Kalziumeinstrom in OTRPC4-exprimierenden Zellen zu etwa 50%, während GdCl₃ bis zu einer Konzentration von 1 mM keinen Effekt zeigte.

Die Mitglieder der STRPC-Subfamilie der TRPC-Kanäle werden durch Signale aktiviert, die bedingt durch die Aktivierung der Phospholipase C-β (PLC-β) entstehen (6-15). Die Aktivierung der endogen exprimierten muskarinergen Rezeptoren und damit Aktivierung der PLC-β in OTRPC4-exprimierenden Zellen zeigte keinen Effekt auf den Kalziumeinstrom in diesen Zellen.

Die Zugabe von Capsaicin (10 µM) und Resiniferatoxin (10 µM), wie auch die kurzfristige Erhöhung der Temperatur auf 65°C hatten keinen Effekt auf Zellen, die OTRPC4 exprimierten.

Elektrophysiologische Charakterisierung von OTRPC4

Parallel zu der Erhöhung der basalen [Ca²⁺]_i zeigten Zellen, die OTRPC4 exprimierten, (detektiert durch Fluoreszenz des GFP-Fusionanteils), einen basalen Ionenstrom gemessen in der sog. Ganzzellkonfiguration. Aufgrund des schnellen „run-down“ der Ionenströme

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

43

wurden die weiteren Experimente mit der sog. „perforated patch“-Methode durchgeführt. Gemessen in Standard-extrazellulärer Lösung zeigte die Strom-Spannungskurve, gemessen durch das Anlegen von Spannungsrampen, eine auswärts rektifizierende Form mit einem Umkehrpotential von ca. 0 mV (Abbildung 6). Wurde aus der extrazellulären Lösung die Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen entfernt, verschwand der Einwärtsstrom und das Umkehrpotential verschob sich in den negativen Bereich. Die durchschnittlichen Ionenströme bei -100 bzw. +100 mV gemessen mit Hilfe von Rampenprotokollen lagen bei $-12,8 \pm 1,1$ bzw. $+32,2 \pm 2,7$ pA/pF ($n=17$, $C_m=9,6 \pm 5,5$ pF). Diese Werte unterschieden sich deutlich von den Werten, die in den Kontrollzellen unter gleichen Bedingungen gemessen wurden; die Kontrollzellen zeigten nur geringe Ionenströme ($-2,6 \pm 0,7$ und $+3,9 \pm 0,9$ pA/pF, $n=5$, $C_m=13,4 \pm 1,5$ pF) mit einer nicht-linearen Strom-Spannungs-Kurve und einem E_r von $-16 \pm 2,1$ mV.

Der Austausch der extrazellulären Standard-Lösung gegen eine Lösung, die 100 mM NaCl und 100 mM Mannitol enthält (Osmolarität: 320 mosmol/l) verschob E_r zu einem negativeren Potential ($-11,2 \pm 1,6$ mV, $n=14$), wie es von einem durch Kationen getragenen Strom bei der Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration zu erwarten wäre (siehe Abbildung 6). Desweiteren wurden die einwärts- als auch die auswärts gerichtete Stromkomponente reduziert ($-7,0 \pm 0,8$ und $22,7 \pm 2,7$ pA/pF bei -100 bzw. +100 mV) (siehe Abbildung 6). Die Applikation einer hypoosmolaren Lösung (215 mosmol/l) führte mit einer Verzögerung von wenigen Sekunden (ca. 18 Sekunden im Mittel) zu einer Erhöhung des einwärts, wie auch des auswärts gerichteten Stroms (Abbildung 7). Das Maximum dieser Erhöhung wurde im Mittel nach 50 Sekunden erreicht. Die maximalen Stromdichten des einwärts bzw. auswärts gerichteten Stroms betrugen $-16,9 \pm 1,4$ bzw. $66,0 \pm 6,1$ pA/pF ($n=13$). Die Strom-Spannungs-Kurve des durch hypoosmolare Lösung aktivierten Stroms hatte die gleiche Form wie die des spontanen Stromes in OTRPC4 exprimierenden Zellen, allerdings war das Umkehrpotential zu stärker positivem Potential verschoben ($-5,6 \pm 0,7$ mV). Die Entfernung von Natrium- und Kalziumionen aus der extrazellulären Lösung führte zu einem kompletten aber reversiblen Block des Einwärtsstromes und reduzierte die auswärts gerichtete Stromkomponenten (siehe Abbildung 7). Nach Austausch der hypotonen Lösung durch Lösung mit 320 mosmol/l wurden wieder niedrige Stromflüsse gemessen, vergleichbar zu den Ausgangswerten vor Zugabe der hypotonen Lösung. In den Kontrollzellen löste die Zugabe von hypotoner extrazellulärer Lösung einen Stromfluß aus, der die Eigenschaften von Chlorid-Kanälen aufwies, die durch Volumenänderung aktiviert



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

44

werden (27). Die Aktivierung dieser Ströme konnte durch die Zugabe des Chloridkanal-Blockers NPPB (50 μ M) vollständig gehemmt werden, während die durch hypotone Lösung ausgelösten Kationenströme in OTRPC4 exprimierenden Zellen durch diesen Blocker nicht beeinflusst wurden.

Um die Ionenselektivität von OTRPC4 zu bestimmen, wurde die hypotone Lösung, die zur Auslösung der Ströme verwendet wurde, durch hypotone Lösungen ersetzt, die entweder nur Natrium oder nur 20 mM Kalzium als Kationen enthielten. Die gemessenen Umkehrpotentiale betrugen für eine Lösung, die nur 100 mM Natrium enthielt, $-14,5 \pm 8,8$ mV ($n=5$) und für eine Lösung, die nur 20 mM Kalzium enthielt, $+5,7 \pm 1,4$ mV ($n=5$). Von diesen Werten konnte ein Verhältnis der Ionenpermeabilität von $6,3 \pm 0,5$ für P_{Ca}/P_{Na} und $0,8 \pm 0,3$ für P_{Na}/P_{Ca} bestimmt werden.

Um zu testen, ob Zugkräfte an der Membran die durch OTRPC4 getragenen Ströme auslösen kann, wurden positive und negative Drücke auf die Patch-Pipette angelegt, wobei die Ganzzellströme sowohl in der „cell-attached-“, als auch in der Ganzzellkonfiguration gemessen wurden. Es wurde keine Beeinflussung der durch OTRPC4 getragenen Ströme durch Druckänderungen festgestellt.

High-throughput Screen zur Identifizierung eines Blockers, Aktivators oder Modulators des OTRPC4-Kationenkanals

Das oben beschriebene eukaryotische Expressionsplasmid mit der OTRPC4-cDNA enthält zusätzlich auch ein Gen, daß den Zellen, die mit diesem Plasmid transfiziert werden, eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418 verleiht. HEK293-Zellen wurden durch Lipofektion wie oben beschrieben transfiziert und stabil exprimierende Zellen durch Selektion mit G418 isoliert. Damit der OTRPC4-Kanal während der Selektionsperiode nicht konstitutiv aktiv ist, wurden die HEK293-Zellen in einem Medium kultiviert, dessen Osmolarität auf 320 mosmol/l eingestellt war. Die den OTRPC4-Kanal stabil exprimierenden HEK293-Zellen wurden in 384 well Platten ausgesät und in den Zellen mit Hilfe eines „Fluorescence Imaging Plate Readers“ (FLIPR) die durch Zugabe von hypotonen Medium ausgelöste Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen.

Konstruktion eines rekombinanten Vektors für einen konditionellen Gene Knock-out:

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

45

Für eine erfolgreiche homologe Rekombination in vivo ist eine identische Sequenz von 6-8 kb Läng notwendig. Das entsprechende Exons muß dabei nicht in der Mitte liegen, sondern es wird allgemein eine asymmetrische Anordnung bevorzugt. Diese erlaubt eine PCR-Analyse der Zellklone der transfizierten ES-Zellen über einen kurzen Bereich von ca 2-3 kb. Dabei bleibt ein langer Arm mit ca 5-6 Kb auf der anderen Seite. Übertragen auf die vorhandene Genstruktur des murinen OTRPC4-Kanals (siehe Abbildung 2) und dem Wunsch die Porenregion zu inaktivieren, boten sich folgende DNA-Konstrukte an. Intron 11, bei Base 1965 gelegen, hat eine Größe > 5 kb, sodaß hier die DNA für den langen Arm gewonnen werden kann. Exon 12 mit ca 420 bp wurde zum Zweck des konditionellen Knock-outs mit flankierenden LoxP-Sites getaggt. Intron 12, bei Base 2286bp liefert noch ausreichende Größe für einen kurzen Arm. Damit fehlt nach dem Knock-out und der Insertion der Neomycin-Kassette das Exon 12 und damit dem Kanalprotein ein Teil der fünften transmembranären Region, die Pore, die sechste transmembranäre Region und ein Teil des anschließenden zytosolischen Bereiches. Das OTRPC4-Protein, das in den konditionellen Knock-out Mäusen exprimiert wird, wird in vivo funktionell inaktiv sein.

Auswahl von Sequenzen zur Herstellung von Anti-sense Oligonukleotiden zur Inaktivierung des OTRPC4-Kanals:

Die in Tabelle 1 aufgeführten Anti-sense Sequenzen wurden nach folgenden Regeln ausgewählt:

- Die Sequenzen weisen möglichst wenig Homologie zu den anderen Kanälen der OTRPC Familie auf.
- Cluster von Guaninen (GGGG) wurden vermieden, da diese zu Sekundärstrukturen und damit zu unspezifischen Interaktionen mit Proteinen führen.
- GC und AT Basenpaare sind in etwa gleich verteilt sein
- eine der Sequenzen überdeckt das ATG, um zusätzlich zur Induktion einer RNase H, die die Target-RNA degradiert, die Hemmung des Translationsstartes als Mechanismus einzuschließen.

Tabelle 1:

Antisense-Oligo 1/Base 6-21 (5'-UTR)
CGT CTG CAC TGC TCA G

17.03.00

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

46

Antisense-Oligo 2/Base 41-55 (kodierend)

CCT TCG CTG GAA TCC

Antisense-Oligo 3/Base 123-137 (kodierend)

GAGGAGAGAGGAAAAGC

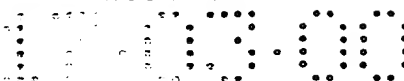
Antisense-Oligo 4/Base 225-240 (kodierend)

CAT GCGCAGATTTGGTGC

Antisense-Oligo 5/Base 303-320 (kodierend)

CACCGAGGACTCATATAG

- 10 Die ausgewählten Antisense Sequenzen können auch als flankierende Sequenzen zur Konstruktion von Ribozymen verwendet werden.



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

47

Literaturstellen

1. Lang, F. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78, 247-306 (1998).
2. Colbert, H. A. et al. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 17, 8259-8269 (1997).
3. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323 (1989).
4. Harteneck, C. et al. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* 23, 159-166 (2000).
5. Phillips, A. M. et al. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* 8, 631-642 (1992).
6. Wes, P. D. et al. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9652-9656 (1995).
7. Zhu, X. et al. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett.* 373, 193-198 (1995).
8. Wissenbach, U. et al. Structure and mRNA expression of a bovine trp homologue related to mammalian trp2. *FEBS Lett.* 429, 61-66 (1998).
9. Zhu, X. et al. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85, 661-671 (1996).
10. Philipp, S. et al. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J.* 15, 6166-6171 (1996).
11. Okada, T. et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca^{2+} channel from mouse brain. *J. Biol. Chem.* 273, 10279-10287 (1998).
12. Philipp, S. et al. A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J.* 17, 4274-4282 (1998).
13. Boulay, G. et al. Cloning and expression of a novel mammalian homologue of *Drosophila* transient receptor potential (TRP) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G_q class of G protein. *J. Biol. Chem.* 272, 29672-29680 (1997).



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

48

14. Okada, T. et al. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. *J. Biol. Chem.* 274, 27359-27370 (1999).
15. Hofmann, T. et al. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-263 (1999).
16. Caterina, M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824 (1997).
17. Tominaga, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543 (1998).
18. Caterina, M. et al. Capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441 (1999).
19. Kanzaki, M. et al. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* 1, 165-170 (1999).
20. Hoenderop, J. G. J. et al. Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -responsive epithelia. *J. Biol. Chem.* 274, 8375-8378 (1999).
21. Peng, J. B. et al. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* 274, 22739-22746 (1999).
22. Hunter, J.J. et al. Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*). *Genomics* 54, 116-123 (1998).
23. Nagami, K. et al. Molecular cloning of a novel putative Ca^{2+} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 54, 124-131 (1998).
22. Thastrup, O. et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466-2470 (1990).
23. Foskett, J. K. in *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (ed. Strange, K.) 259-277 (CRC Press, Boca Raton, 1994).
24. Yang, X. C. & Sachs, F. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 243, 1068-1071 (1989).
25. Urbach, V. et al. Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells. *J. Memb. Biol.* 168, 29-37 (1999).
26. Nilius, B. et al. Volume-activated Cl^- channels. *Gen. Pharmacol.* 27, 1131-1140 (1996).



Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

49

Legenden zu den Abbildungen

Abbildung 1: Aminosäuresequenz der vorgeschlagenen Porenbildenden Struktur von OTRPC4 und die Gewebeverteilung der Expression von OTRPC4.

- 5 (a) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der vorhergesagten fünften und sechsten transmembranären Domäne und der benachbarten cytosolischen Domäne von OTRPC4. Die transmembranäre Region 5 und 6 und die vermutliche Porenbildende cytoplasmatische Domäne sind als solche bezeichnet, und die konservierten Aminosäuren sind hinterlegt. (b) Autoradiogramm eines Northern-Blots unterschiedlicher Maus Geweben unter Verwendung
10 der EST-Sequenzen der Maus-cDNA codierend für OTRPC4 als Probe. Ein 3,3 kb Fragment wird in der RNA von Herz, Leber, Niere und Testis nachgewiesen, ein zusätzliches 2,2 kb Fragment kann in der RNA von Leber und Niere nachgewiesen werden.

- 15 **Abbildung 2:** Sequenzen der cDNA codierend für OTRPC4 der Maus und Organisation des genomischen Klonen von OTRPC4. Der Translationsstart, der Stopcodons, sowie die Übergänge zwischen Exons und Introns und die Länge der Introns sind bezeichnet. Unter der DNA-Sequenz ist die Aminosäuresequenz dargestellt, die vorhergesagten transmembranären Regionen und die Ankyrin-Bindungsstelle sind bezeichnet.

- 20 **Abbildung 3:** In-situ-Hybridisierung von Maus-Niere und -Hirn zum Nachweis der Expression von OTRPC4.

- Darstellt sind ein Sagittalschnitt (a) und ein Horizontalschnitt (f) einer gesamten Maus Niere, zwei Vergrößerungen des Sagittalschnittes der Niere (b, c), ein Sagittalschnitt (e), ein Koronarschnitt (f), ein Horizontalschnitt (g) eines gesamten Maus-Hirns und eine
25 Vergrößerung des Sagittalschnittes eines Maus-Hirns (h). Die entsprechenden Schnitte wurden nach Fixierung des Gewebes mit einem Mikrotom angefertigt und anschließend mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde des kodierenden Bereiches von Maus-OTRPC4 hybridisiert. Gezeigt ist die Expression von OTRPC4 im distalen Konvolut der Niere (b, c) und im Plexus choroideus der Hirn-Ventrikel (h).

- 30 **Abbildung 4:** Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration in HEK293 Zellen transfiziert mit einem Plasmid, das die cDNA von OTRPC4 exprimiert. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mit Hilfe der FURA-2-Technik in Zellen gemessen, die OTRPC4 exprimieren und zu Zellen verglichen, die diesen Kanal nicht exprimieren. Die
35 Zellen wurden anfänglich in isotoner Lösung, die 100 mM Mannitol und 1 mM CaCl_2 enthielt, kultiviert. Der obere horizontale Balken gibt den Wechsel der extrazellulären Lösung, mit der die Zellen umspült wurden, zu einer 200 mM Lösung an. Der Wechsel der Osmolarität wurde dadurch erreicht, daß das Mannitol weggelassen wurde. In dem Zeitraum, der durch den unteren horizontalen Balken angegeben wird, wurde das Kalzium
40 in der extrazellulären Lösung durch EGTA ersetzt. Die gezeigten Spuren stellen die Mittelwerte aus 17 Zellen (für die OTRPC4-exprimierenden Zellen) und 21 Zellen (für die Kontrollzellen) dar im gleichen Experiment dar. Die kleine Abbildung zeigt die entsprechenden Meßspuren für einzelne OTRPC4-exprimierenden Zellen desselben Experimentes.

- 45 **Abbildung 5:** Osmolaritätsabhängige Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in HEK293-Zellen, die OTRPC4 transient exprimieren. Gezeigt ist der maximalen

Boehringer Ingelheim-Pharma KG

Case 1-1128

50

Fluoreszenzquotienten des Kalzium-beladenen und -unbeladen FURA-2 Farbstoffes in Abhängigkeit zur Osmolarität der extrazellulären Lösung.

Abbildung 6: Abnahme des Ionenflusses in OTRPC4-exprimierenden Zellen in einer hyperosmolaren extrazellulären Lösung. Der Ionenfluß wurde durch Spannungsrampen von -100 bis +100 mV in einer Standard extrazellulären Lösung (Osmolarität 305 mosmol/l; 1) und nach Zugabe einer Mannitol enthaltenden Lösung mit einer Osmolarität von 320 mosmol/l (2) aufgenommen. die kleine Abbildung zeigt den Zeitverlauf des Effektes ausgelöst durch die Erhöhung der Osmolarität der extrazellulären Lösung.

Abbildung 7: Zunahme des Ionenflusses getragen durch Kationen ausgelöst durch hypotone extrazelluläre Lösung in Zellen, die OTRPC4 exprimieren. (A) Der Ganzzell-Ionenstrom einer OTRPC4 exprimierenden Zelle wurde gemessen bei -100 und +100 mV. Zu dem Zeitpunkt, die am horizontalen Balken angegeben sind, wurde die extrazelluläre Standard-Lösung ausgetauscht gegen eine Lösung, die 100 mM NaCl und 100 mM Mannitol (Osmolarität 320 mosmol/l) enthielt, dann gegen ein Lösung ohne Mannitol (215 mosmol/l) und dann wiederum durch eine hypoosmolare Lösung, in der Natrium und Kalzium durch NMDG ersetzt war. Zum Schluß wurde die Zelle wieder mit 320 milliosmolare Lösung umspült. (B) Aufgetragen ist der Ionenstrom, der durch eine einzelne Spannungsrampe in einer OTRPC4 exprimierenden Zelle zu den Zeitpunkten, die in (A) mit Zahlen bezeichnet sind, ausgelöst wurde.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

51

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für den nicht-selektiven Kationenkanal OTRPC4 oder für ein Fragment, eine funktionelle Variante, eine allele Variante, eine Untereinheit kodiert, oder Varianten der besagten Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes oder eine Nukleinsäure, die an besagte Nukleinsäure hybridisieren kann.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie RNS ist.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie DNS ist.
4. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie 5' oder 3' oder 5' und 3' untranslatierte Regionen enthält.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Fragment des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 kodiert.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine funktionelle Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 kodiert.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine allele Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 kodiert.
8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie für Varianten der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes kodiert.
9. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie an eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 8 unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann.
10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß besagter nicht-selektiver Kationenkanal OTRPC4 ein Säugerkationenkanal ist.
11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß besagter nicht-selektiver Kationenkanal OTRPC4 murin ist.
12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß besagter nicht-selektiver Kationenkanal OTRPC4 human ist.
13. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz
CTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACAATGGCGGATTCCAGCGAA
GGCCCCCGCGCGGGGGCCCGGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGG
CACCCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGG
GGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTCACCGGCTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

52

AGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCCAGGGCGCCTTCCGCAAGG
GGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGG
TGCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATC
GTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAG
5 CCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTC
AACCGGCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGAC
GGGCTGCTCCCATTTCTTGCTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTT
CGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAG
CAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCG
10 GCAACATGCGGGAGTTCATTAACCTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCGAGGTC
AGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACACTACGTGGAACCTC
TCGTGGCCCAGGGAGCTGATGTCCAGCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGC
CCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGGCTG
CCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGA
15 AGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTG
GTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTAC
GACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCC
GTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCTCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAA
GATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACAC
20 GGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGATTCCTCGC
TTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGA
TCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGAG
CCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTC
TACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACCGCCT
25 ACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCACGGTGGAC
TACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCTGTCTTC
TTCACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTC
TTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTATCG
TCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCT
30 TTGCCCTGGTCTGCGGCTGGATGAATGCCCTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGC
TGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCC
GATTCCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

53

CCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACCAACT
GCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCC
TCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCA
GCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCA
5 CCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCC
AGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATC
CTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGG
GAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGTG
CTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCA
10 TCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCATA
CCGTGGGCCCGCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCCCTCGGTGGTACCCCGCGTGGTG
GAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCAT
GGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGA
CTGAGGACGCCCCGCTCTAGGGACTGCAGCCCAGCCCCAGCTTCTCTGCCCACT
15 CATTTCTAGTCCAGCCGCAATTCAGCAGTGCCTTCTGGGGTGTCCCCCACACC
CTGCTTTGGCCCCAGAGGCGAGGGACCAGTGGAGGTGCCAGGGAGGCCCCAGG
ACCCTGTGGTCCCTGGCTCTGCCTCCCCACCCTGGGGTGGGGGCTCCCGGCCA
CCTGTCTTGCTCCTATGGAGTCACATAAGCCAACGCCAGAGCCCCTCCACCTCA
GGCCCCAGCCCCTGCCTCTCCATTATTTATTTGCTCTGCTCTCAGGAAGCGACG
20 TGACCCCTGCCCCAGCTGGAACCTGGCAGAGGCCTTAGGACCCCGTTCCAAGTG
CACTGCCCCGGCCAAGCCCCAGCCTCAGCCTGCGCCTGAGCTGCATGCGCCACCA
TTTTTGGCAGCGTGGCAGCTTTGCAAGGGGCTGGGGCCCTCGGCGTGGGGCCA
TGCCTTCTGTGTGTTCTGTAGTGTCTGGGATTTGCCGGTGCTCAATAAATGTTTA
TTCATTGACGGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

25 oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Codes umfaßt.

14. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

30 CTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGGCACAATGGCGGATTCCAGCGAA
GGCCCCCGCGCGGGGCCCCGGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGG
CACCCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

54

GGAGGATGGCTCCCTTTTCGCCCTCACCGGCTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCC
AGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCCAGGGCGCCTTCCGCAAGG
GGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGG
TGCTGGGCCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATC
5 GTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAG
CCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTC
AACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGAC
GGGCTGCTCCCATTTCTTGCTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTT
CGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAG
10 CAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCG
GCAACATGCGGGAGTTCATTAACCTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCGAGGTCT
AGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACACTACGTGGAACCTTC
TCGTGGCCCAGGGAGCTGATGTCCACGCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGC
CCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGGCTG
15 CCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGA
AGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTG
GTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTAC
GACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCC
GTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCTCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAA
20 GATTGGGATCTTTTCAGCACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACAC
GGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGTATTCCTCGC
TTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGA
TCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGAG
CCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTC
25 TACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACCGCCT
ACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCAACGGTGGAC
TACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCTGTCTTC
TTCACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTC
TTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCTGGTGATCG
30 TCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCT
TTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGC
TGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

55

GATTCCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTC
CCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACCAACT
GCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCC
TCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCA
5 GCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCA
CCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCC
AGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATC
CTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGG
GAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGTG
10 CTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCA
TCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCATA
CCGTGGGCCCGCTCCGCAAGGATCGCTGGTCTCGGTGGTACCCCGCGTGGTG
GAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCAT
GGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGA
15 CTGAGGACGCCCCGCTCTAGGGACTGCAGCCCAGCCCCAGCTTCTCTGCCCCACT
CATTTCTAGTCCAGCCGCATTTTCAGCAGTGCCTTCTGGGGTGTCCCCCACACC
CTGCTTTGGCCCCAGAGGCGAGGGACCAGTGGAGGTGCCAGGGAGGCCCCAGG
ACCCTGTGGTCCCCCTGGCTCTGCCTCCCCACCCTGGGGTGGGGGCTCCCGGCCA
CCTGTCTTGCTCCTATGGAGTCACATAAGCCAACGCCAGAGCCCCCTCCACCTCA
20 GGCCCCAGCCCCCTGCCTCTCCATTATTTATTTGCTCTGCTCTCAGGAAGCGACG
TGACCCCTGCCCCAGCTGGAACCTGGCAGAGGCCTTAGGACCCCGTTCCAAGTG
CACTGCCCGGCCAAGCCCCAGCCTCAGCCTGCGCCTGAGCTGCATGCGCCACCA
TTTTTGGCAGCGTGGCAGCTTTGCAAGGGGCTGGGGCCCTCGGCGTGGGGCCA
TGCCTTCTGTGTGTTCTGTAGTGTCTGGGATTTGCCGGTGCTCAATAAATGTTTA
25 TTCATTGACGGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

hat.

15. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGCGGGGCCCGGGGAGGTGGCTGAGCT
CCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCT
30 GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTTCGCCCTCACCGGCTGATGC
CAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCC
AGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

56

CTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTG
TTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAA
GAAGATCATAGAGAAGCAGCCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGC
CCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGG
5 GCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATTCTTGCTGACCCACAAGAAAC
GCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCC
AAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTG
GACATCGCGGAGCGCACCCGGCAACATGCGGGAGTTCATTAACCTCGCCCTTCCGT
GACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGC
10 AAACACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCAAGGAGCTGATGTCCAAGCCCAGGCC
CGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGA
GCTGCCCCCTGTCGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCT
GACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACATGCGGGCGCCAGGACTCGCGAGGC
AACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACAC
15 CAAGTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTT
CCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCCTCAT
GATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGG
AGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCC
TATGGGCCAGTGTATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGG
20 GAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCG
CCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGC
GCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCA
TGGTCATCTTCACTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGT
ACCCTTACCGCACCAACGGTGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCAATTACGC
25 TCTTCACTGGGGTCCTGTTCTTCTTCAACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGA
AATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTT
CATCTACTCTGTCTGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGA
GGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATGCCCT
TACTTCAACCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAA
30 GATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATC
GGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTG
TGCAATGAGGACCAGACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGAC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

57

AGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATG
GGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTG
CTGGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCC
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAG
CTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTG
AGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGG
CACTCCTGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGATGAGGTGAAGTGGTCTCACTG
GAACCAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACC
AGTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCTCCGCAGGGATCGCTGGTCTC
CGGTGGTACCCCGCGTGGTGGAAGTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTG
GTGGTGCCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGG
TTACCCCGCAAGTGGAGGACTGAGGACGCCCCGCTCTAG

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes umfaßt.

16. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGCGGGGCCCGGGGAGGTGGCTGAGCT
CCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCT
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTTGCGCCCTCACCGGCTGATGC
CAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCC
AGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACC
CTATATGAGTCCTCGGTGGTGCTGGGCCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTG
TTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAA
GAAGATCATAGAGAAGCAGCCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCCTCAGCCGC
CCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGG
GCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATTTCTGCTGACCCACAAGAAAC
GCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCC
AAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTG
GACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGGGAGTTCATTAAGTACGCCCTTCCGT
GACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGC
AAACACTACGTGGAAGTTCTCGTGGCCCAGGGAGCTGATGTCCAAGCCCAGGCC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

58

CGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGA
GCTGCCCCCTGTCGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCT
GACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACATGCGGGCGCCAGGACTCGCGAGGC
AACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACAC
5 CAAGTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTT
CCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCCTCAT
GATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGG
AGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCC
TATGGGCCAGTGTATTCCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGG
10 GAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCG
CCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGC
GCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCA
TGGTCATCTTCACTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGT
ACCCTTACCGCACCACGGTGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGC
15 TCTTCACTGGGGTCCTGTTCTTCTTACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGA
AATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTT
CATCTACTCTGTCCCTGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGA
GGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCCCT
TTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAA
20 GATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATC
GGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTG
TGCAATGAGGACCAGACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGAC
AGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATG
GGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTG
25 CTGGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCC
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAG
CTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCTG
AGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGG
CACTCCTGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTG
30 GAACCAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACC
AGTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCCT
CGGTGGTACCCCGCGTGGTGGAAGTGAACAAGAAGTGAACCCGGACGAGGTG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

59

GTGGTGCCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGG
TTACCCCCGCAAGTGGAGGACTGAGGACGCCCCGCTCTAG

hat.

17. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

5 GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGTGGCRGSRGGAKCAG
GACTCGGCCGGAGGGATCAGGAAGCGGCGGCGCTGCGCCCGCGTCCTGAGGCT
GAGAAGTACAAACAGATCTGGGTCCAGTATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCC
GTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCCCCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCT
GGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAA
10 GGCTCCTCTTCTCTTTCCCCGGTGGATGCTAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGAT
GGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCAGGGCGCTTTCCGCAAGGGGGTTCCC
AACCCCATTTGACCTGTTGGAGTCCACCCGGTACGAGTCCTCAGTAGTGCCTGGG
CCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCCCTTGTTTCGACTACGGCACTTACCGTCACCAC
CCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAAAGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGA
15 GCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGC
CCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCTCCACTGCGGACCTAGATGGACTGC
TCTCCTTCTTGTTGACCCACAAGAAGCGCCTGACTGATGAGGAGTTCCGGGAGC
CGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGG
CGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGACATTGCGGAGCGCACCGGCAACAT
20 GCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGACATCTACTACCGAGGCCAGACATC
CCTGCACATTGCCATCGAACGGGCGCTGCAAGCACTACGTGGAGCTGCTGGTGG
CCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCCCGCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAG
GATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTTGTCCTTGGCAGCCTGC
ACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGACAGAGAACCCTCACAAGAAAGC
25 TGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGAACACGGTGCTGCACGCGCTGGTGG
CCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTACGAC
CTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGACAGTT
CTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATGGCTGCCAAGACAGGCAAGATC
GGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGTGACAGATGAGGACACCCGGCA
30 TCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCTGTGTATTCTTCTCTTA
CGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGGAGGTGTCCGTGCTGGAGATCCT
GGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCATGAGATGCTGGCTGTAGAGCCCA

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

60

TTAACGAACTGTTGAGAGACAAGTGGCGTAAGTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACA
TCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACCCTCACCGCCTACTA
TCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCTACCCTTACCGGACCACAGTGGACTACCT
GAGGCTGGCTGGCGAGGTCATCACGCTCTTCACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTAC
5 CAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGT
CGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATCTACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCT
GCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCCTACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCC
CTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTACTTCACGCGCGGGTTGAAGCTGAC
GGGGACCTACAGCATCATGATTGAGAAGATCCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTT
10 CCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGCTATGCCTCAGCCCTGGTCACCCTC
CTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGTGACGAGGACCAGAGCAACTGCAC
GGTGCCACGTATCCTGCGTGCCGCGACAGCGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCT
GGACCTCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGGAGACCTGGAGATGCTGAGCAGCG
CCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCTGGTCACCTACATCATCCTCACCTT
15 CGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTCATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGT
GTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGG
ACATCGAGCGTTCCTTCCCTGTGTTCTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCCGGAGAGA
TGGTGACTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCACTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTC
AGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCATTAA
20 CGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCAGTACTATGGCTTCTCCCACACCGT
GGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCTCGGTGGTGCCCCGCGTAGTGGAGC
TGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGGTGGTACCCCTGGATAACCTAGGG
AACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGCTACGCTCCCAAGTGGAGGACGGA
CGATGCCCCACTGTAGGGGCGGTGCCAGAGCTCGCACAGATAGTCCAGGCTTG
25 GCCTTCGCTCCCACCTACATTTAGGCATTTGTCCGGTGTCTTCCCACACCCGCAT
GGGACCTTGGAGGTGAGGGCCTCTGTGGCGACTCTGTGGAGGGCCCCAGGACCC
TCTGGTCCCCGCCAAGACTTTTGCCTTCAGCTCTACTCCCCACATGGGGGGGCG
GGGCTCCTGGCTACCTGTCTCGCTCGCTCCCATGGAGTCACCTAAGCCAGCACA
AGGCCCTCTCCTCGAAAGGCTCAGGCCCATCCCTCTTGTGTATTATTTATTGC
30 TCTCCTCAGGAAAATGGGGTGGCAGGAGTCCACCCGCGGCTGGAACCTGGCCA
GGGCTGAAGCTCATGCAGGGACGCTGCAGCTCCGACCTGCCACAGATCTGACC
TGCTGCAGCCCTGGCTAGTGTGGGTCTTCTGTACTTTGAAGAGATCGGGGCCGC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

61

TGGTGCTCAATAAATGTTTATTCTCGGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AA

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten
Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von
besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Kodes
umfaßt, worin R ein A oder G, M ein A oder C, S ein C oder G, Y ein C oder T, K ein G
oder T und W ein A oder T sein kann.

18. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGTGGCRGSRGGAKCAG
GACTCGGCCGGAGGGATCAGGAAGCGGCGGCGCTGCGCCCGCGTCTTGAGGCT
GAGAAGTACAAACAGATCTGGGTCCAGTATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCC
GTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCCCCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCT
GGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAA
GGCTCCTCTTCTCTTTCCCCGGTGGATGCTAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGAT
GGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCAGGGCGCTTTCGCAAGGGGGTTCCC
AACCCCATTTGACCTGTTGGAGTCCACCCGGTACGAGTCCTCAGTAGTGCTGGG
CCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTGTTCGACTACGGCACTTACCGTCACCAC
CCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAAAGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGA
GCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGC
CCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCTCCACTGCGGACCTAGATGGACTGC
TCTCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCCTGACTGATGAGGAGTTCGGGGAGC
CGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGG
CGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGACATTGCGGAGCGCACCGGCAACAT
GCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGACATCTACTACCGAGGCCAGACATC
CCTGCACATTGCCATCGAACGGCGCTGCAAGCACTACGTGGAGCTGCTGGTGG
CCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCCCGCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAG
GATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTTGTCCCTGGCAGCCTGC
ACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGACAGAGAACCCTCACAAGAAAGC
TGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGAACACGGTGCTGCACGCGCTGGTGG
CCATCGCCGACAACCCCGAGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTACGAC
CTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGACAGTT

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

62

CTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATGGCTGCCAAGACAGGCAAGATC
GGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGTGACAGATGAGGACACCCGGCA
TCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCTGTGTATTCTTCTCTCTA
CGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGGAGGTGTCCGTGCTGGAGATCCT
5 GGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCATGAGATGCTGGCTGTAGAGCCCA
TTAACGAACTGTTGAGAGACAAGTGGCGTAAGTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACA
TCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACCCTCACCGCCTACTA
TCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCTACCCTTACCGGACCACAGTGGACTACCT
GAGGCTGGCTGGCGAGGTCATCACGCTCTTCACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTAC
10 CAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGT
CGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATCTACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCT
GCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCCTACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCC
CTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTACTTCACGCGCGGGTTGAAGCTGAC
GGGGACCTACAGCATCATGATTCAGAAGATCCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTT
15 CCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGCTATGCCTCAGCCCTGGTCACCCTC
CTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGTGACGAGGACCAGAGCAACTGCAC
GGTGCCACAGTATCCTGCGTGCCGCGACAGCGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCT
GGACCTCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGGAGACCTGGAGATGCTGAGCAGCG
CCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCTGGTCACCTACATCATCCTCACCTT
20 CGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTCATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGT
GTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGG
ACATCGAGCGTTCCCTCCCTGTGTTCCCTGAGGAAGGCCCTTCGCTCCGGAGAGA
TGGTGA CTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCACTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTC
AGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCATTA
25 CGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCAGTACTATGGCTTCTCCCACACCGT
GGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCCCTCGGTGGTGCCCCGCGTAGTGGAGC
TGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGGTGGTACCCCTGGATAACCTAGGG
AACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGCTACGCTCCCAAGTGGAGGACGGA
CGATGCCCCACTGTAGGGGCCGTGCCAGAGCTCGCACAGATAGTCCAGGCTTG
30 GCCTTCGCTCCCACCTACATTTAGGCATTTGTCCGGTGTCTTCCCACACCCGCAT
GGGACCTTGGAGGTGAGGGCCTCTGTGGCGACTCTGTGGAGGCCCCAGGACCC
TCTGGTCCCCGCCAAGACTTTTGCCCTCAGCTCTACTCCCCACATGGGGGGGCG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

63

GGGCTCCTGGCTACCTGTCTCGCTCGCTCCCATGGAGTCACCTAAGCCAGCACACA
AGGCCCOCTCTCCTCGAAAGGCTCAGGCCCCATCCCTCTTGTGTATTATTTATTGC
TCTCCTCAGGAAAATGGGGTGGCAGGAGTCCACCCGCGGCTGGAACCTGGCCA
GGGCTGAAGCTCATGCAGGGACGCTGCAGCTCCGACCTGCCACAGATCTGACC
5 TGCTGCAGCCCTGGCTAGTGTGGGTCTTCTGTACTTTGAAGAGATCGGGGGCCGA
TGGTGCTCAATAAATGTTTATTCTCGGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AA

hat, worin R ein A oder G, M ein A oder C, S ein C oder G, Y ein C oder T, K ein G oder
10 T und W ein A oder T sein kann.

19. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

ATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCCGTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCC
CCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCTGGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCT
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAAGGCTCCTCTTCTCTTTCCCGGTGGATGC
15 TAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGATGGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCA
GGGCGCTTTCCGCAAGGGGGTTCCCAACCCCATTTGACCTGTTGGAGTCCACCCG
GTACGAGTCCTCAGTAGTGCCTGGGCCCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTTGTT
CGACTACGGCACTTACCGTCACCACCCCAAGTACACAAGAGATGGAGGAGAA
AGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGAGCCCCAAAGCTCCTGCACCCCAAGCCACCC
20 CCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGCCCATGCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGGCT
CCACTGCGGACCTAGATGGACTGCTCTCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCC
TGA CTGATGAGGAGTTCCGGGAGCCGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAG
GCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGGCGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGA
CATTGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGA
25 CATCTACTACCGAGGCCAGACATCCCTGCACATTGCCATCGAACGGCGCTGCAA
GCACTACGTGGAGCTGCTGGTGGCCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCCAAGGCC
GCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGC
TGCCCTTGTCCTTGGCAGCCTGCACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGA
CAGAGAACCCTCACAAGAAAGCTGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGGAAC
30 ACGGTGCTGCACGCGCTGGTGGCCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACACCAA
GTTTGTCACCAAGATGTACGACCTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCC
GACAGCAACCTGGAGACAGTTCTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATG

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

64

GCTGCCAAGACAGGCAAGATCGGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGT
GACAGATGAGGACACCCGGCATCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATG
GGCCTGTGTATTCTTCTCTCTACGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGG
AGGTGTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCAT
5 GAGATGCTGGCTGTAGAGCCCATTAAACGAAGTGTGAGAGACAAGTGGCGTAA
GTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGT
CATCTTCACCCCTCACCGCCTACTATCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCATCCC
TTACCGGACCACAGTGGACTACCTGAGGCTGGCTGGCGAGGTCATCACGCTCTT
CACAGGAGTCCCTGTTCTTCTTTACCAGTATCAAAGACTTGTTTCACGAAGAAATG
10 CCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGTCGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATC
TACTCTGTGCTGGTGGTGTCTCTGCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCC
TACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTAC
TTCACGCGCGGGTTGAAGCTGACGGGGACCTACAGCATCATGATTCAGAAGAT
CCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTTCCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGC
15 TATGCCTCAGCCCTGGTCACCCCTCCTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGT
GACGAGGACCAGAGCAACTGCACGGTGCCACGTATCCTGCGTGCCGCGACAG
CGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCTGGACCTCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGG
AGACCTGGAGATGCTGAGCAGCGCCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCT
GGTCACCTACATCATCCTCACCTTCGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTC
20 ATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGTGTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTT
GCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATCGAGCGTTCCTTCCCTGTGTTCTGAG
GAAGGCCTTCCGCTCCGGAGAGATGGTGACTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCA
CTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGG
AACCAGAACTTGGGCATCATTAAACGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCA
25 GTACTATGGCTTCTCCACACCGTGGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCCTC
GGTGGTGGCCCCGCGTAGTGGAGCTGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGG
TGGTACCCCTGGATAACCTAGGGAACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGC
TACGCTCCCAAGTGGAGGACGGACGATGCCCCACTGTAG

oder eine Teilsequenz hiervon, eine Nukleinsäure, die an besagte Sequenz unter stringenten
30 Bedingungen hybridisieren kann, eine allele Variante oder eine funktionelle Variante von
besagter Sequenz oder eine Variante der Nukleinsäure aufgrund des degenerativen Codes
umfaßt.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

65

20. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz

ATGGCAGATCCTGGTGATGGTCCCCGTGCAGCGCCTGGGGAGGTGGCTGAGCC
CCCTGGAGATGAGAGTGGTACCTCTGGTGGGGAGGCCTTCCCCCTCTCTTCCCT
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGAAGGCTCCTCTTCTCTTTCCCCGGTGGATGC
5 TAGCCGCCCTGCTGGCCCTGGCGATGGACGTCCAAACCTGCGTATGAAGTTCCA
GGGCGCTTTCCGCAAGGGGGTTCCCAACCCCATGACCTGTTGGAGTCCACCCG
GTACGAGTCCTCAGTAGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCGCCCATGGATTCTTGT
CGACTACGGCACTTACCGTCACCACCCAGTGACAACAAGAGATGGAGGAGAA
AGGTCGTGGAGAAGCAGCCACAGAGCCCCAAAGCTCCTGCACCCAGCCACCC
10 CCCATCCTCAAAGTCTTCAATCGGCCCATCCTCTTTGACATTGTGTCCCGGGGCT
CCACTGCGGACCTAGATGGACTGCTCTCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCC
TGACTGATGAGGAGTTCCGGGAGCCGTCCACGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAG
GCGCTGCTGAACCTAAGCAACGGGCGCAACGACACCATCCCGGTGTTGCTGGA
CATTGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGTGAATTCATCAACTCGCCCTTCAGAGA
15 CATCTACTACCGAGGCCAGACATCCCTGCACATTGCCATCGAACGGCGCTGCAA
GCACTACGTGGAGCTGCTGGTGGCCCAGGGAGCCGACGTGCACGCCAGGCC
GCGGCCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGAGGCTACTTCTACTTTGGGGAGC
TGCCCTTGTCCTTGGCAGCCTGCACCAACCAGCCGCACATCGTCAACTACCTGA
CAGAGAACCCTCACAAGAAAGCTGACATGAGGCGACAGGACTCGAGGGGGAAC
20 ACGGTGCTGCACGCGCTGGTGGCCATCGCCGACAACACCCGAGAGAACACCAA
GTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTTCTCAAGTGTTACGCCTCTTCCCC
GACAGCAACCTGGAGACAGTTCTCAACAATGATGGCCTTTCGCCTCTCATGATG
GCTGCCAAGACAGGCAAGATCGGGGTCTTTCAGCACATCATCCGACGTGAGGT
GACAGATGAGGACACCCGGCATCTGTCTCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATG
25 GGCCTGTGTATTCTTCTCTACGACCTCTCCTCCCTGGACACATGCGGGGAGG
AGGTGTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACCGCCAT
GAGATGCTGGCTGTAGAGCCCATTAACGAAGTGTGAGAGACAAGTGGCGTAA
GTTTGGGGCTGTGTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTATCTGTGTGCCATGGT
CATCTTCACCCTCACCGCCTACTATCAGCCACTGGAGGGCACGCCACCCTACCC
30 TTACCGGACCACAGTGGACTACCTGAGGCTGGCTGGCGAGGTCATCACGCTCTT
CACAGGAGTCCTGTTCTTCTTTACCAGTATCAAAGACTTGTTACGAAGAAATG
CCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCGTCGATGGCTCCTTCCAGTTACTCTACTTCATC

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

66

TACTCTGTGCTGGTGGTTGTCTCTGCGGCGCTCTACCTGGCTGGGATCGAGGCC
TACCTGGCTGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCGCTGTAC
TTCACGCGCGGGTTGAAGCTGACGGGGACCTACAGCATCATGATTCAGAAGAT
CCTCTTCAAAGACCTCTTCCGCTTCCTGCTTGTGTACCTGCTCTTCATGATCGGC
5 TATGCCTCAGCCCTGGTCACCCCTCCTGAATCCGTGCACCAACATGAAGGTCTGT
GACGAGGACCAGAGCAACTGCACGGTGCCACGTATCCTGCGTGCCGCGACAG
CGAGACCTTCAGCGCCTTCCTCCTGGACCTCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGG
AGACCTGGAGATGCTGAGCAGCGCCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCCTCCTGCT
GGTCACCTACATCATCCTCACCTTCGTGCTCCTGTTGAACATGCTTATCGCCCTC
10 ATGGGTGAGACCGTGGGCCAGGTGTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGTT
GCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATCGAGCGTTCCTTCCCTGTGTTCCCTGAG
GAAGGCCCTCCGCTCCGGAGAGATGGTGA CTGTGGGCAAGAGCTCAGATGGCA
CTCCGGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGACGAGGTGAACTGGTCTCACTGG
AACCAGAACTTGGGCATCATTAACGAGGACCCTGGCAAGAGTGAAATCTACCA
15 GTACTATGGCTTCTCCACACCGTGGGGCGCCTTCGTAGGGATCGTTGGTCCTC
GGTGGTGCCCCGCGTAGTGAGCTGAACAAGAACTCAAGCGCAGATGAAGTGG
TGGTACCCCTGGATAACCTAGGGAACCCCAACTGTGACGGCCACCAGCAGGGC
TACGCTCCCAAGTGGAGGACGGACGATGCCCCACTGTAG

hat.

- 20 21. Rekombinanter Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 enthält.
22. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Expressionsvektor ist.
23. Wirt, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Vektor nach Anspruch 21 oder 22 enthält.
- 25 24. Wirt nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß er eine eukaryontische Wirtszelle ist.
25. Wirt nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Insektenzelle ist.
26. Wirt nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sf9-, HEK293- oder HeLa- Zelle ist.
- 30 27. Wirt nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Bakteriophage ist.
28. Wirt nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß er eine prokaryontische Wirtszelle ist.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

67

29. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 kodiert wird, oder ein Fragment, eine funktionelle Variante, eine allele Variante, eine Untereinheit, eine Variante aufgrund des degenerativen Nukleinsäure-Kodes, ein chemisches Derivat hiervon, ein Fusionsprotein mit besagtem Polypeptid oder eine Glykosilierungs-Variante hiervon.
30. Polypeptid nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fragment des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.
31. Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß es eine funktionelle Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.
32. Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß es eine allele Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.
33. Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Untereinheit des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.
34. Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 aufgrund des degenerativen Nukleinsäure-Kodes ist.
35. Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß es ein chemisches Derivat des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.
36. Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fusionsprotein aus dem nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 und einem weiteren Protein ist.
37. Polypeptid nach einem der Ansprüche 25 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Glykosilierungs-Variante des nicht-selektiven Kationenkanals OTRPC4 ist.
38. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden nach einem der Ansprüche 29 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirt nach einem der Ansprüche 23 bis 28 kultiviert wird und besagtes Polypeptid isoliert wird.
39. Antikörperprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es spezifisch für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 37 ist.
40. Verfahren zur Herstellung von einem Antikörperprotein nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt: Ein Wirt ausgewählt aus einer eukaryontischen oder prokaryontischen Zelle, welcher einen oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Nukleinsäuren spezifisch für das Antikörperprotein enthält, wird

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

68

unter Bedingungen, unter denen besagtes Antikörperprotein durch besagte Wirtszelle exprimiert wird, kultiviert, und besagtes Antikörperprotein wird isoliert.

41. Verwendung eines Polypeptides nach einem der Ansprüche 29 bis 37 zum Auffinden von Antagonisten, Agonisten oder Modulatoren besagter Polypeptide.
42. Verwendung eines Wirtes nach einem der Ansprüche nach einem der Ansprüche 23 bis 28 zum Auffinden von Blocker, Aktivatoren oder Modulatoren von OTRPC4 Kanälen.
43. Verfahren zum Auffinden von Blocker, Aktivatoren oder Modulatoren von OTRPC4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirt nach einem der Ansprüche 23 bis 28 mit einer Testsubstanz inkubiert wird.
44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß ein Membranstrom gemessen wird, besagter Membranstrom mit einem Membranstrom verglichen wird, der bei besagtem Wirt nach Inkubation mit einer bekannten Kontrollsubstanz oder in Abwesenheit der Testsubstanz gemessen wird.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, daß besagter Blocker an einen Kanal gebunden ist, besagter Wirt mit einer Testsubstanz inkubiert wird und die Verdrängung des an den Kanal gebundenen Blockers oder Aktivators durch die Testsubstanz gemessen wird.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirt nach einem der Ansprüche 23 bis 28 mit einer Testsubstanz inkubiert wird, die intrazelluläre Menge eines divalenten Kationes bestimmt wird und besagte Menge des divalenten Kationes mit der Menge besagten divalenten Kationes verglichen wird, die bei der Inkubation besagten Wirtes mit einer bekannten Kontrolle oder in der Abwesenheit der Testsubstanz gemessen wird.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß besagtes Verfahren ein Hochdurchsatzmusterungstest (HTS) oder ein Ultrahochdurchsatzmusterungstest (UHTS) ist.
48. Aktivator von OTRPC4, auffindbar mit einem Verfahren nach Anspruch 43 bis 47.
49. Blocker von OTRPC4, auffindbar mit einem Verfahren nach Anspruch 43 bis 47.
50. Modulator von OTRPC4, auffindbar mit einem Verfahren nach Anspruch 43 bis 47.
51. Anti-Sinn-Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie an einen Teil einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

69

52. Anti-Sinn-Nukleinsäure nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Ribozym ist.
53. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.
54. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Anti-Sinn-Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 51 bis 52 sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.
55. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 29 bis 37 sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.
56. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Vektor nach einem der Ansprüche 21 bis 22 sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.
57. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Wirt nach einem der Ansprüche 23 bis 28 sowie pharmazeutisch akzeptable Träger- oder Hilfsstoffe enthält.
58. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, Schock sowie weiteren pathophysiologischen Zuständen, die durch Hyper- und Hypoosmolarität charakterisiert sind.
59. Verwendung einer Anti-Sinn-Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 51 bis 52 zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, Schock sowie weiteren pathophysiologischen Zuständen, die durch Hyper- und Hypoosmolarität charakterisiert sind.
60. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 21 bis 22 zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, Schock sowie weiteren pathophysiologischen Zuständen, die durch Hyper- und Hypoosmolarität charakterisiert sind.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

70

61. Verwendung eines Wirts nach einem der Ansprüche 23 bis 28 zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe von Diabetes, Hyperlipidämie, Hyperproteinämie, Hypertonus, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, Schock sowie weiteren pathophysiologischen Zuständen, die durch Hyper- und Hypoosmolarität charakterisiert sind.
62. Nicht menschlicher Säuger, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich zu seinem Genom eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 (Transgen) enthält.
63. Nicht menschlicher Säuger, dadurch gekennzeichnet, daß in seinem Genom eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 inaktiviert (Gen-Knock-out) ist.
64. Nicht menschlicher Säuger, dadurch gekennzeichnet, daß in seinem Genom eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 modifiziert (Gen-Knock-in) ist.
65. Verfahren zur Herstellung eines nicht menschlichen Säugers, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) embryonale Stammzellen besagten nicht menschlichen Säugetiers mit einem Vektor transfiziert werden, der eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 enthält sowie eine Rekombination zwischen der genomischen DNA besagten nicht menschlichen Säugetieres und der im Vektor enthaltenen Nukleinsäure ermöglicht
 - b) stabil transfizierte Stammzellen aus Schritt a) isoliert werden und diese in die Keimbahn ein weibliches Tier besagten nicht menschlichen Säugetieres überführt werden
 - c) die Nachkommen besagten weiblichen Tieres aus Schritt b) mit einem männlichen Tier derselben Art werden auf Tiere, die das durch die Nukleinsäure aus Schritt a) kodierte Polypeptid exprimieren, analysiert.
66. Verfahren zur Herstellung eines nicht menschlichen Säugers, dadurch gekennzeichnet, daß
- d) embryonale Stammzellen des besagten nicht menschlichen Säugetiers mit einem Vektor transfiziert werden, der eine Nukleinsäure enthält, die an eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann und durch Insertion einer zusätzlichen Nukleinsäuresequenz inaktiviert ist sowie eine Rekombination zwischen der genomischen DNA des besagten nicht menschlichen Säugetieres und der im Vektor enthaltenen Nukleinsäure ermöglicht

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

71

- e) stabil transfizierte Stammzellen aus Schritt d) isoliert werden und diese in die Keimbahn eines weiblichen Tieres des besagten nicht menschlichen Säugetieres überführt werden.
- f) die Nachkommen des besagten weiblichen Tieres aus Schritt e) mit einem männlichen Tier derselben Art werden auf Tiere, die das durch die Nukleinsäure aus Schritt d) kodierte Polypeptid gering oder überhaupt nicht exprimieren, analysiert.
67. Verfahren zur Herstellung eines nicht menschlichen Säugers, dadurch gekennzeichnet, daß
- g) embryonale Stammzellen des besagten nicht menschlichen Säugetiers mit einem Vektor transfiziert werden, der eine Nukleinsäure enthält, die an eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20 unter stringenten Bedingungen hybridisieren kann und durch Insertion einer zusätzlichen Nukleinsäuresequenz modifiziert ist, sowie eine Rekombination zwischen der genomischen DNA besagten nicht menschlichen Säugetieres und der im Vektor enthaltenen Nukleinsäure ermöglicht
- h) stabil transfizierte Stammzellen aus Schritt g) isoliert werden und diese in die Keimbahn ein weibliches Tier des besagten nicht menschlichen Säugetieres überführt werden
- i) die Nachkommen des besagten weiblichen Tieres aus Schritt h) mit einem männlichen Tier derselben Art werden auf Tiere, die das durch die Nukleinsäure aus Schritt g) kodierte Polypeptid exprimieren, analysiert.

Boehringer Ingelheim Pharma KG

Case 1-1128

72

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für den nicht-selektiven Kationenkanal OTRPC4 kodieren, sowie Polypeptide, die durch besagte Nukleinsäuren kodiert werden. Weiterhin betrifft die Erfindung Wirte bzw. Wirtszellen, die besagtes Polypeptid exprimieren und Verfahren zum Auffinden von Blocker, Aktivator sowie Modulatoren besagter OTRPC4-Kationenkanäle. Die Erfindung umfaßt Blocker, Aktivatoren und Modulatoren besagter OTRPC4-Kationenkanäle sowie pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend besagte Blocker, Aktivatoren und Modulatoren. Außerdem
10 betrifft die Erfindung nicht humane Säuger, die entweder OTRPC4 als Transgen, inaktiviertes Gen (knock-out) oder modifiziertes Gen (knock-in) enthalten.

A 10x10 grid of dots forming the letters 'L E D'. The 'L' is on the left, 'E' is in the middle, and 'D' is on the right. The dots are arranged in a way that the letters are clearly recognizable.

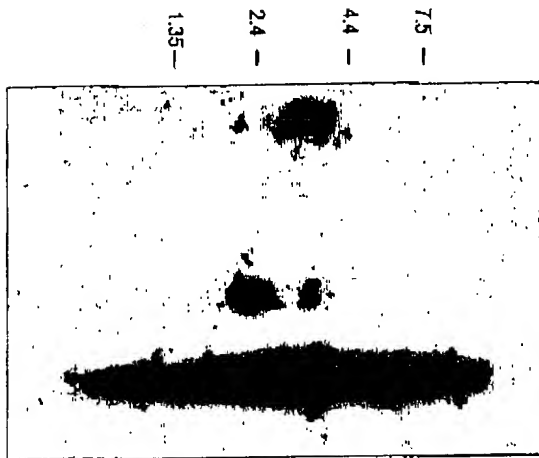
TM5

JOSEPH - ES A FLORIDA
Vermulete Portenregion

TM6

OTRPC4 G C U K H W T I R P V F L E V T K S I T R

Herz
Hirn
Milz
Lunge
Leber
Skel. Muskel
Niere
Hoden



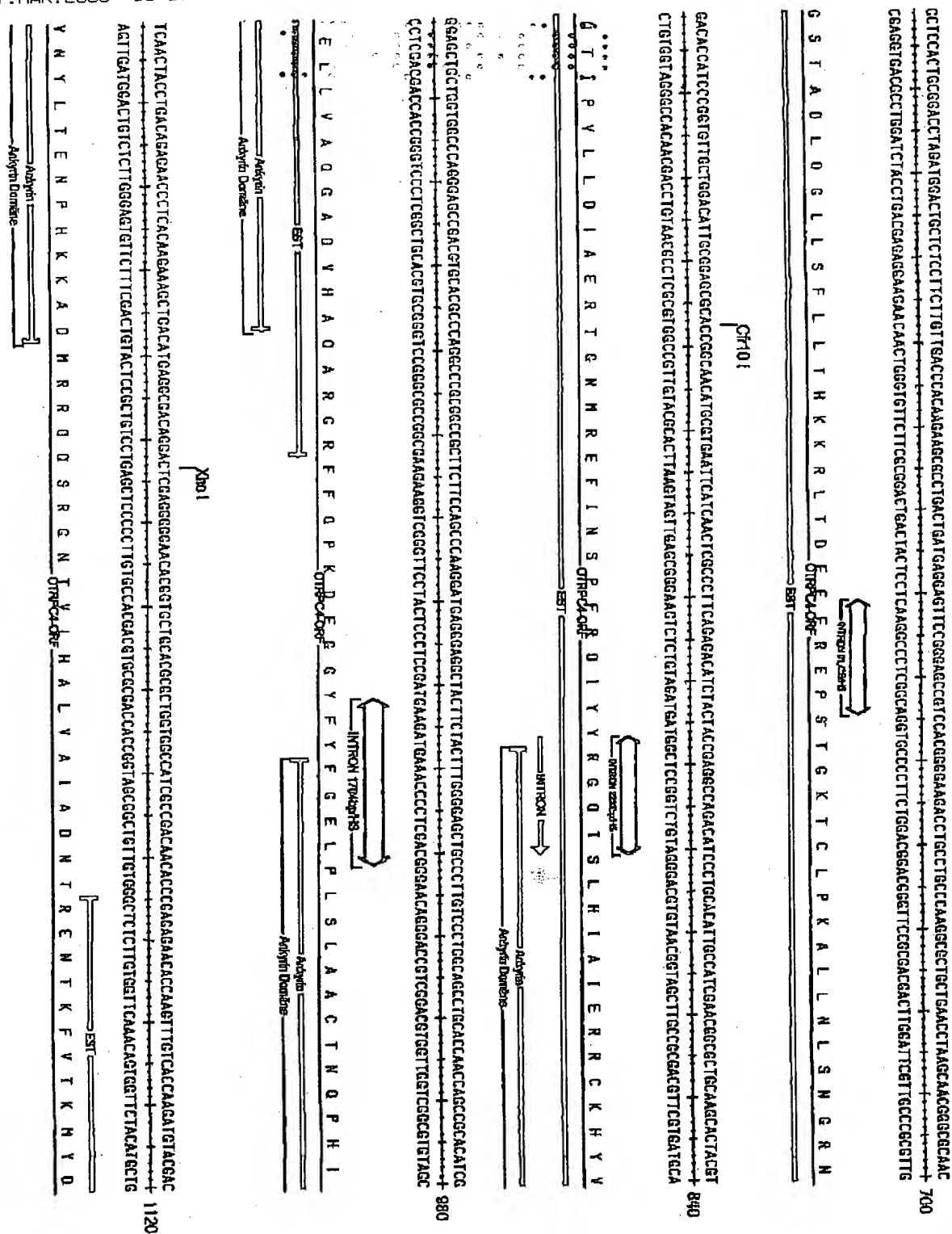


Fig. 2a (II)

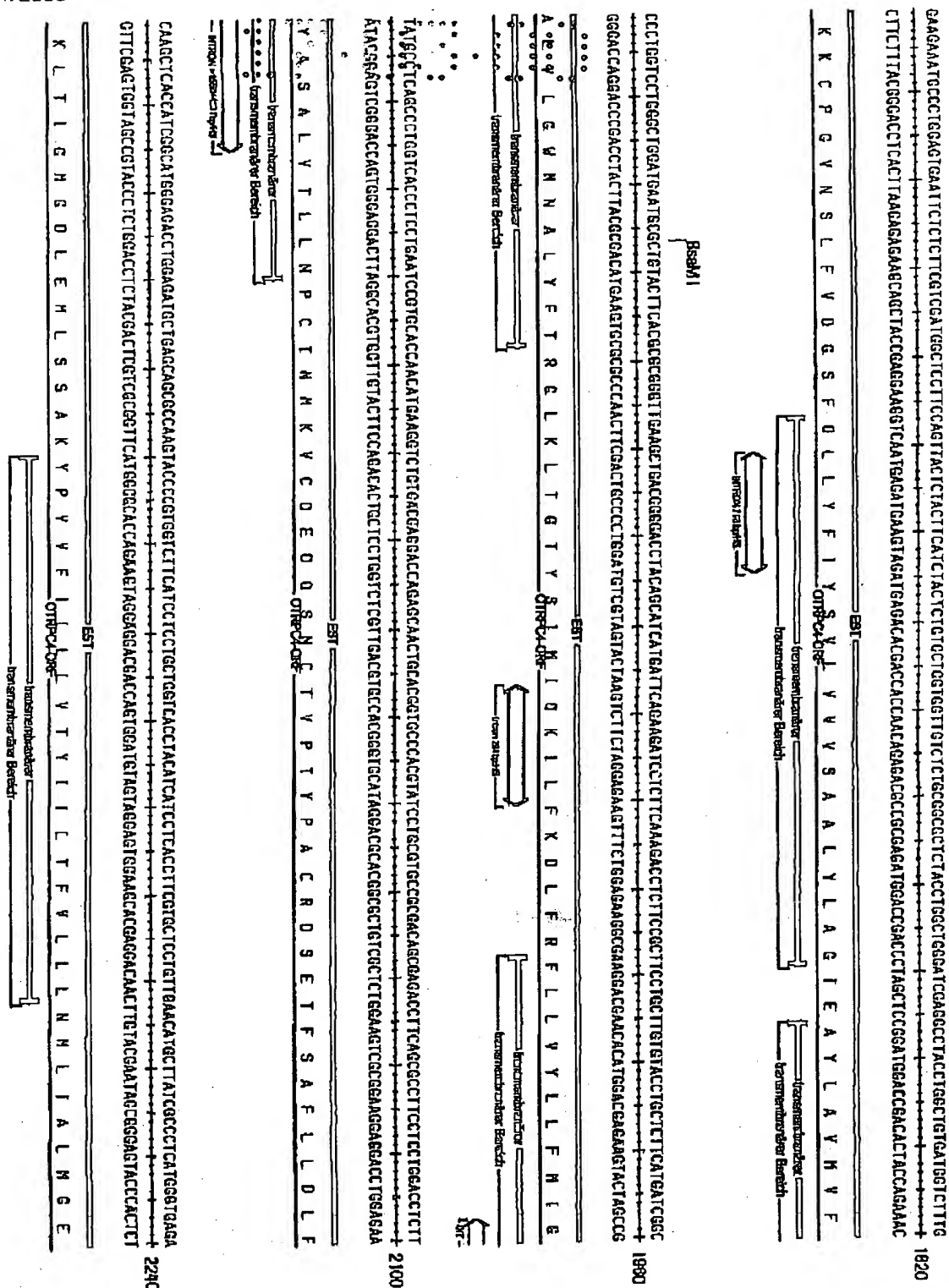


Fig. 2a (IV)

[illegible]

Fig. 2a (V)

Page 6

A 3x3 grid of dots. The dots are arranged in a cross shape, with a vertical column of 5 dots and a horizontal row of 3 dots. The center dot is shared by both the row and the column.

Datum 17.03.00 16:03 FAXG3 Nr: 241713 von NVS:FAXG3.I0.0101/0061327798401 (Seite 11 von 24)

17.03.00

Fig. 2b

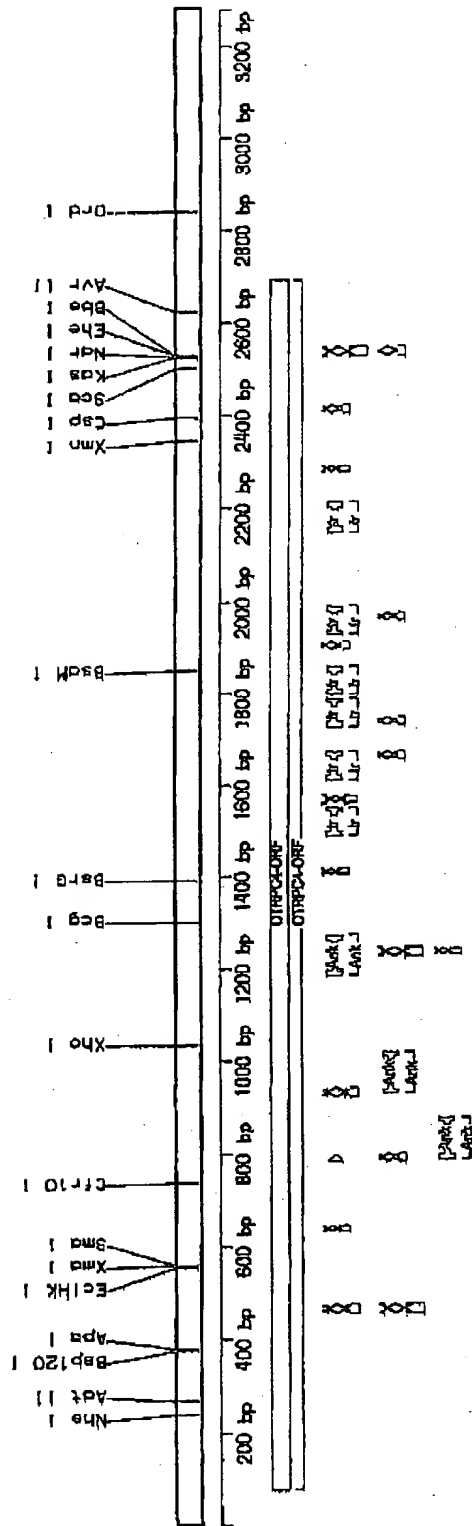
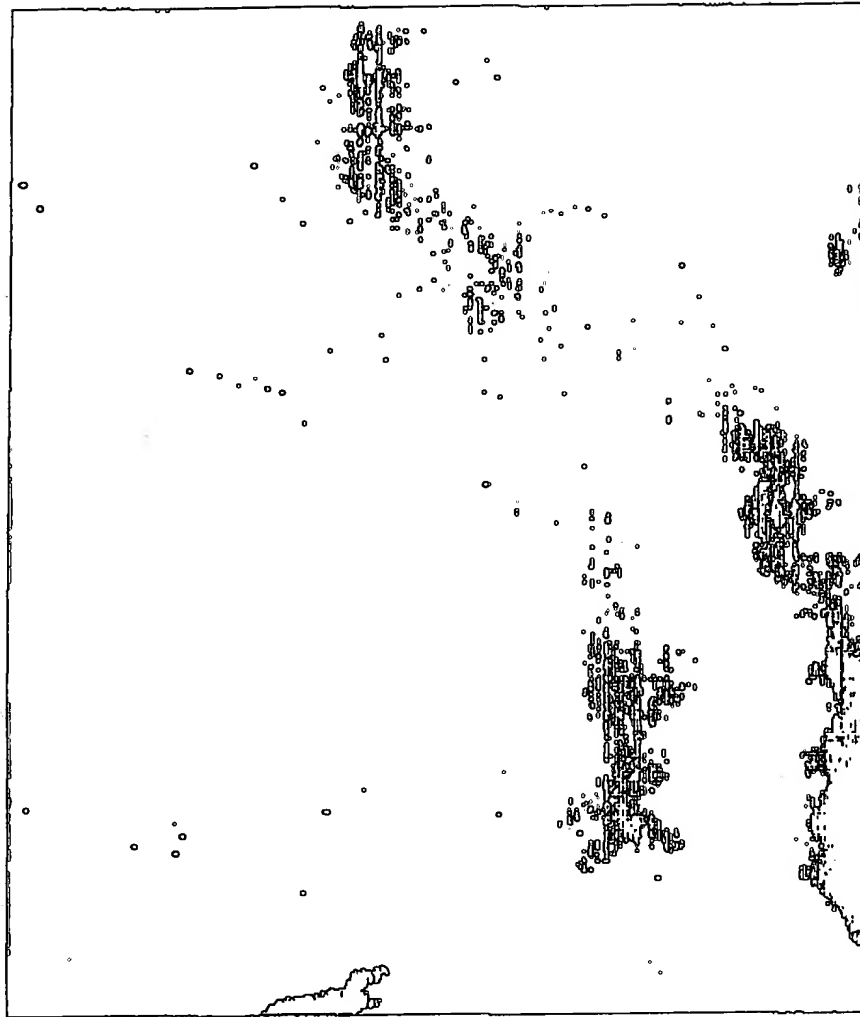


Fig. 3a

Maus Niere Sagitalanschnitt



17.03.00



Maus Niere Sagitalanschnitt

Fig. 3b

17.03.00



Maus Niere Sagittalschnitt

Fig. 3c

Fig. 3d

Maus Niere Horizontalanschnitt



Maus Hirn Sagitalanschnitt

Fig. 3e

Maus Hirn Koronaranschnitt

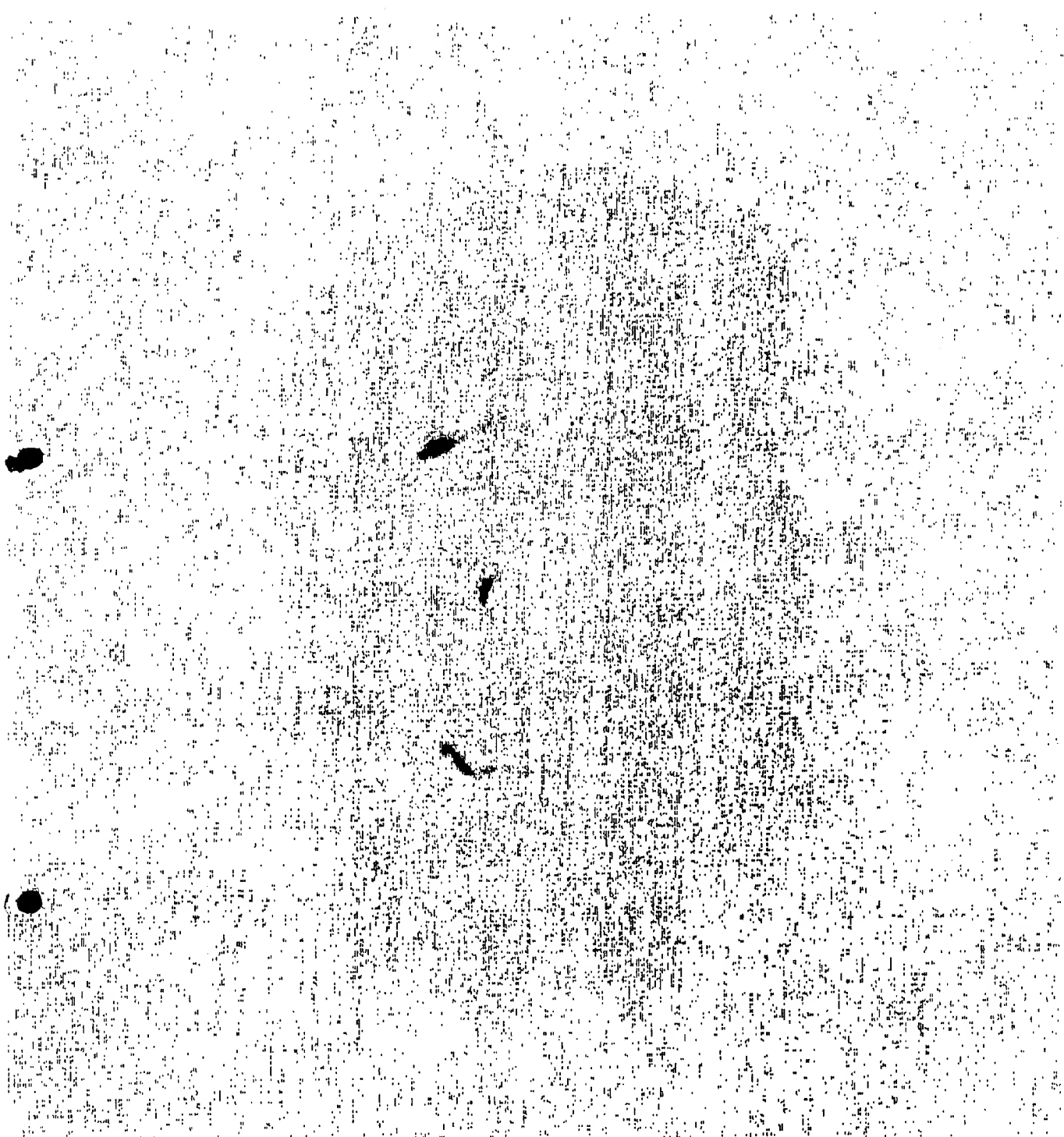
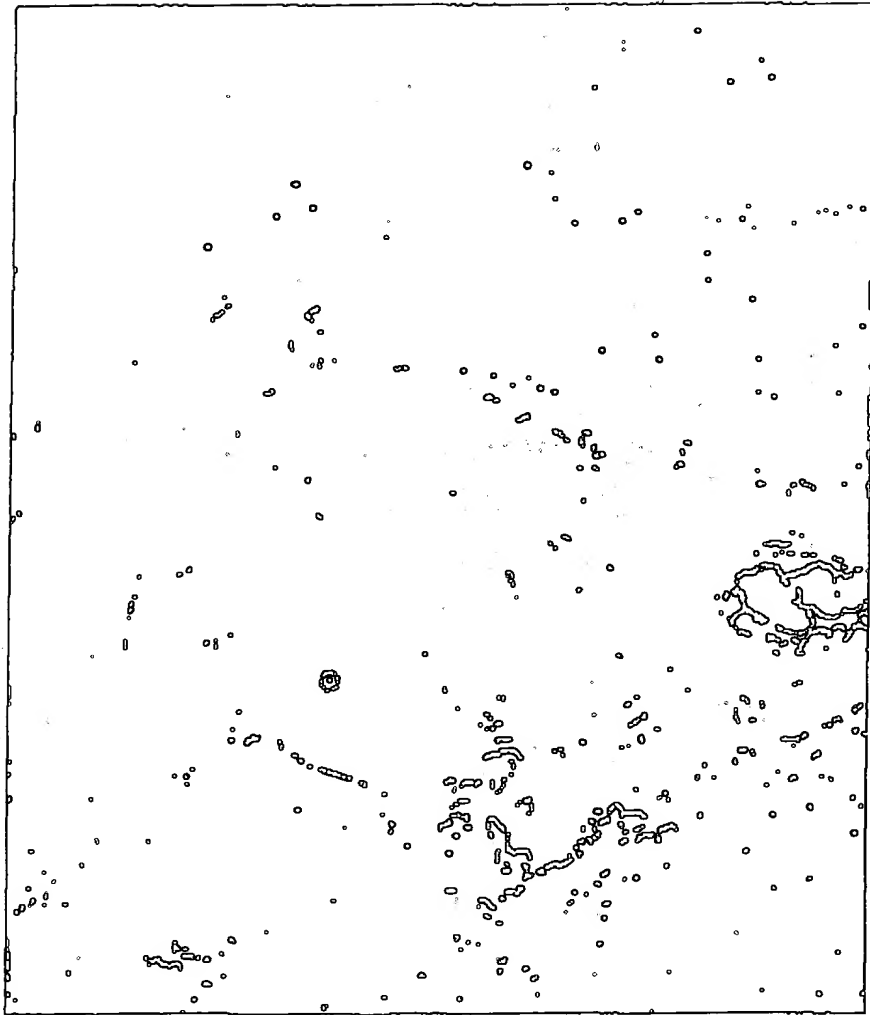


Fig. 3f

Maus Hirn Horizontalanschnitt

Fig. 3g



Maus Plexus choroideus.

Fig. 3h

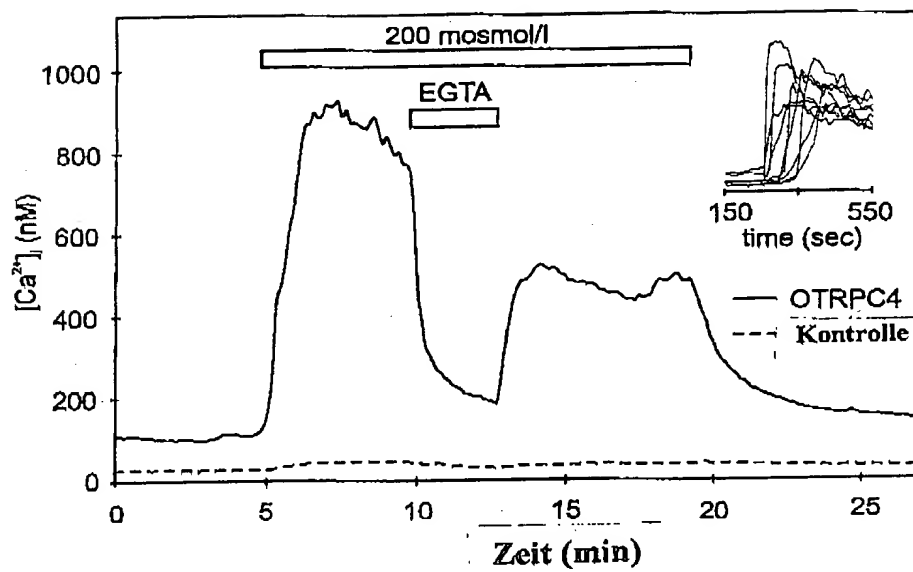


Fig. 4

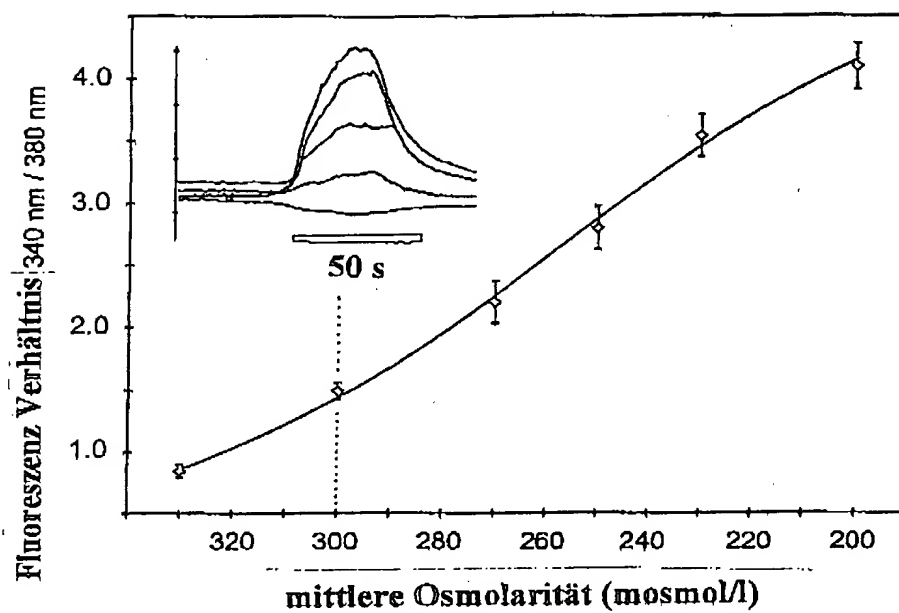


Fig. 5

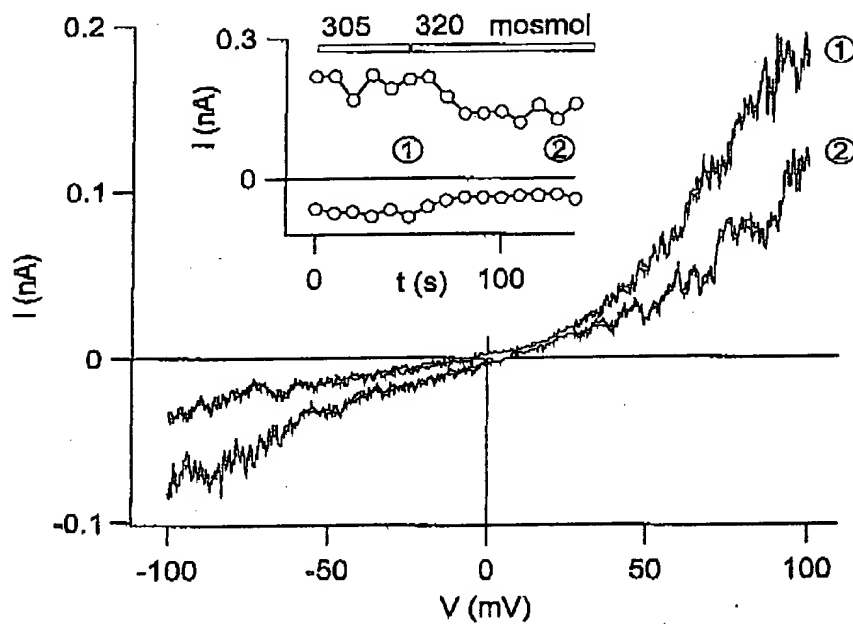


Fig. 6

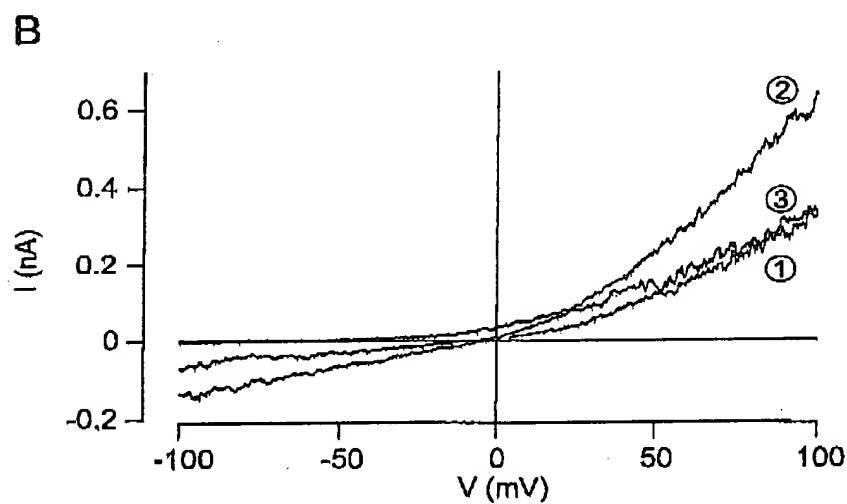
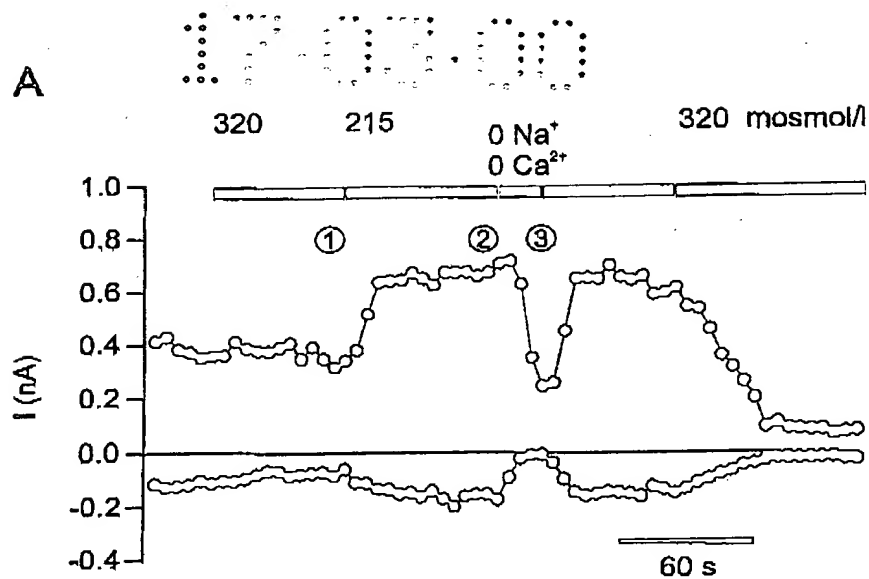


Fig. 7